

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1906-1907 — N° 88.

---

Travail des laboratoires de chimie médicale et d'hygiène  
de la Faculté de médecine et de pharmacie de Lyon.

---

QUELQUES RECHERCHES NOUVELLES

SUR

# LES CULTURES MICROBIENNES

en milieux chimiquement définis

---

## THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON.

Et soutenue publiquement le 26 janvier 1907

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

**Joseph GALIMARD**

PHARMACIEN DE 1<sup>re</sup> CLASSE

DOCTEUR EN PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

PRÉPARATEUR DE CHIMIE MÉDICALE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON

LAURÉAT DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON.

ET DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE DIJON

*Né à Dijon (Côte-d'Or), le 24 mai 1878.*



LYON

IMPRIMERIES REUNIES

DELAROCHE ET SCHNEIDER

8, RUE RACHAIS, 8

—  
1907







Travail des laboratoires de chimie médicale et d'hygiène  
de la Faculté de médecine et de pharmacie de Lyon.

---

QUELQUES RECHERCHES NOUVELLES

SUR

# LES CULTURES MICROBIENNES

en milieux chimiquement définis



FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1906-1907 — N° 88.

---

Travail des laboratoires de chimie médicale et d'hygiène  
de la Faculté de médecine et de pharmacie de Lyon

---

QUELQUES RECHERCHES NOUVELLES

SUR

# LES CULTURES MICROBIENNES

en milieux chimiquement définis

---

## THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 26 janvier 1907

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

**Joseph GALIMARD**

PHARMACIEN DE 1<sup>re</sup> CLASSE

DOCTEUR EN PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

LICENCIÉ ÈS SCIENCES

PRÉPARATEUR DE CHIMIE MÉDICALE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON

LAURÉAT DE LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE DIJON

*Né à Dijon (Côte-d'Or), le 24 mai 1878.*



LYON

IMPRIMERIES RÉUNIES

DELAROCHE ET SCHNEIDER

8, RUE RACHAIS, 8

—  
1907

# PERSONNEL DE LA FACULTÉ

MM. HUGOUNENQ. . . . . DOYEN.  
J. COURMONT . . . . . ASSESSEUR.

DOYEN HONORAIRE  
M. LORTET

PROFESSEURS HONORAIRES  
MM. CHAUVEAU, AUGAGNEUR, MONOYER

## PROFESSEURS

|                                                           |                 |
|-----------------------------------------------------------|-----------------|
| Cliniques médicales . . . . .                             | MM. LÉPINE.     |
| Cliniques chirurgicales . . . . .                         | BONDET.         |
| Clinique obstétricale et Accouchements . . . . .          | BARD.           |
| Clinique ophtalmologique . . . . .                        | PONCET.         |
| Clinique des maladies cutanées et syphilitiques . . . . . | JABOULAY.       |
| Clinique des maladies mentales . . . . .                  | FABRE.          |
| Clinique des maladies des enfants . . . . .               | ROLLET.         |
| Clinique des maladies des femmes . . . . .                | NICOLAS.        |
| Physique médicale . . . . .                               | PIERRET.        |
| Chimie médicale et pharmaceutique . . . . .               | WEILL.          |
| Chimie organique et Toxicologie . . . . .                 | POLLOSSON (A.). |
| Matière médicale et Botanique . . . . .                   | X...            |
| Parasitologie . . . . .                                   | HUGOUNENQ.      |
| Anatomie . . . . .                                        | CAZENEUVE.      |
| Anatomie générale et Histologie . . . . .                 | BEAUVISAGE.     |
| Physiologie . . . . .                                     | GUIART.         |
| Pathologie interne . . . . .                              | TESTUT.         |
| Pathologie et Thérapeutique générales . . . . .           | RENAUT.         |
| Anatomie pathologique . . . . .                           | MORAT.          |
| Médecine opératoire . . . . .                             | TEISSIER.       |
| Médecine expérimentale et comparée . . . . .              | MAYET.          |
| Médecine légale . . . . .                                 | TRIPPIER.       |
| Hygiène . . . . .                                         | POLLOSSON (M.)  |
| Thérapeutique . . . . .                                   | ARLOING.        |
| Pharmacologie . . . . .                                   | LACASSAGNE.     |
|                                                           | COURMONT (J.).  |
|                                                           | SOULIER.        |
|                                                           | FLORENCE.       |

## PROFESSEUR ADJOINT

Physiologie, cours complémentaire . . . . . M. DOYON.

## CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES

|                                                      |             |       |
|------------------------------------------------------|-------------|-------|
| Pathologie externe . . . . .                         | MM. VALLAS, | agréé |
| Maladies des voies urinaires . . . . .               | ROCHET,     | —     |
| Maladies des oreilles, du nez et du larynx . . . . . | CHANDELUX,  | —     |
| Propédeutique médicale . . . . .                     | LANNOIS,    | —     |
| Propédeutique chirurgicale . . . . .                 | ROQUE,      | —     |
| Propédeutique de gynécologie . . . . .               | BERARD,     | —     |
| Anatomie pathologique . . . . .                      | CONDAMIN,   | —     |
| Hygiène administrative . . . . .                     | DEVIC,      | —     |
| Thérapeutique générale . . . . .                     | ROUX,       | —     |
| Accouchements . . . . .                              | COLLET,     | —     |
| Matière médicale . . . . .                           | COMMANDEUR  | —     |
| Embryologie . . . . .                                | MOREAU,     | —     |
| Anatomie topographique . . . . .                     | REGAUD,     | —     |
|                                                      | ANCEL,      | —     |

## AGRÉGÉS

|                 |               |             |                  |
|-----------------|---------------|-------------|------------------|
| MM.             | MM.           | MM.         | MM.              |
| ROUX.           | SAMBUC.       | REGAUD.     | MOREL.           |
| BARRAL.         | BORDIER.      | CAUSSE,     | NEVEU-LEMAIRE.   |
| PIC.            | COURMONT (P.) | ANCEL.      | PATEL.           |
| PAVIOT.         | CHATIN.       | COMMANDEUR. | J. LÉPINE, ch... |
| NOVÉ-JOSSERAND. | VILLARD.      | GAYET.      | PLAUCHU, ch...   |
| BÉRARD.         | TIXIER.       |             |                  |

M. BAYLE, Secrétaire.

## EXAMINATEURS DE LA THESE

M. HUGOUNENQ, Président; M. J. COURMONT, Assesseur;

MM. ROUX et MOREL, Agrégés.

*La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les Dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.*

## DU MÊME AUTEUR

1. DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES PAR L'ACIDE IODIQUE, EN PRÉSENCE DE L'ACIDE SULFURIQUE. — Thèse ph<sup>ie</sup>. 1<sup>re</sup> cl., Lyon, 1900. Rey, édit., 36 p.
2. ACTION DU BROME SUR LA CINCHONIDINE ET SUR DEUX BIBROMOCINCHONIDINES  $\alpha$  ET  $\beta$ . — Thèse doct. en ph<sup>ie</sup>, Lyon, 1900. Storck, édit., 50 p.
3. SUR LES DÉRIVÉS BROMÉS DE LA CINCHONIDINE. — *Bull. Soc. chim.*, Paris, (3), t. XXV, p. 84.
4. ANALYSE D'UNE CONCRÉTION OSSIFORME DE LA GLANDE THYROÏDE. — in thèse Monéry, Lyon, 1903.
5. SUR UNE ALBUMINE EXTRAITE DES ŒUFS DE GRENOUILLE. — *C. R. Acad. Sc.*, t. XXXVIII, p. 1354, 1904.
6. RECHERCHES SUR L'ANALYSE DES OS DANS UN CAS D'OSTÉOMALACIE INFANTILE, en collaboration avec le D<sup>r</sup> P. Kœnig, — *Journal Pharm. et Chim.* (6), t. XXI, p. 352, 1905.
7. ACTION DES RAYONS X SUR LES PLATINOCYANURES ET EN PARTICULIER SUR CELUI DE BARYUM, en collaboration avec le Prof. H. Bordier. — *Congrès de Roentgen, Berlin*, 1905.
8. ACTION DES RAYONS X SUR LES PLATINOCYANURES; CONSÉQUENCES PRATIQUES DE CETTE ÉTUDE, en collaboration avec le Prof. H. Bordier. — *Soc. méd. Hôp., Lyon*, 9 mai 1905.
9. ACTION DES RAYONS X SUR LE DÉVELOPPEMENT DE L'EMBRYON DE POULET, en collaboration avec le Prof. H. Bordier. — *Soc. méd. Hôp., Lyon*, 6 juin 1905, et *Arch. élec. méd.* XIII, p. 491.
10. EMPLOI DES PASTILLES AU PLATINOCYANURE DE BARYUM POUR LES DOSAGES RADIOTHÉRAPIQUES, réponse à MM. Saboureaux et Noiré. — *Lyon Médical*, 16 juillet 1905.
11. ACTION DE LA LUMIÈRE SUR LE PHOSPHORE BLANC DISSOUS DANS L'ÉTHÉR, en collaboration avec le prof. H. Bordier. — *Congrès de l'AFAS.*, Cherbourg 1905 et *Bull. Ass. Doct. Pharm.*, t. IV, p. 214.
12. LES RAYONS X ONT-ILS LA PROPRIÉTÉ DE PROVOQUER DES EFFETS CHIMIQUES? ACTION DE CES RAYONS SUR LES SUBSTANCES À L'ÉTAT COLLOÏDAL, en collaboration avec le Prof. H. Bordier. — *Congrès de l'AFAS.*, Cherbourg 1905.
13. SUR LA RÉGÉNÉRATION ET LA RÉCUPÉRATION DU PLATINOCYANURE DE BARYUM DES ÉCRANS BRUNIS, en collab. avec le Prof. H. Bordier. — *Congrès de l'AFAS.*, Cherbourg 1905, et *Arch. élec. méd.*, t. XIII, p. 832.
14. ACTION DES RAYONS X SUR LES PLATINOCYANURES, ÉTAT ACTUEL DE LA QUESTION, en collaboration avec le Prof. H. Bordier. — *Journ. Etud. Pharm.*, Lyon, 1905, p. 121 et suiv.
15. SUR LA KÉRATINE DES ŒUFS DE COULEUVRE. — *Journ. Pharm. et Chim.* (6), t. XXI, p. 499, 1905.
16. QUELQUES AZOÏQUES DÉRIVÉS DE LA TYROSINE, en collab. avec M. H. Chavassieu. — *Bull. Ass. Doct. Pharm.*, t. V, p. 28, 1906.
17. NOTE SUR LA PRÉSENCE DE L'ARSENIC DANS LES GLYCÉRINES « DITES PURES », en collaboration avec M. E. Verdier. — *Jour. Pharm. et Chim.* (6), t. XXIII, p. 183, 1906.
18. SUR LES ACIDES DIAMINÉS DÉRIVÉS DE L'OVALBUMINE, en collaboration avec le Prof. Hugounenq. — *C. R. Acad. Sc.*, t. CXLIII, p. 242, 1906.

19. CULTURE DE MICROBES EN MILIEUX CHIMIQUEMENT DÉFINIS, en collaboration avec MM. L. Lacomme et A. Morel. — *C. R. Acad. Sc.*, t. CXLIII, p. 349, 1906.
  20. SUR LA VRAIE NATURE DES GLUCOPROTÉINES  $\alpha$  DE M. LEPIERRE, en collaboration avec MM. Lacomme et A. Morel. — *C. R. Acad. Sc.*, t. CXLIII, p. 298, 1906.
  21. UNE NOUVELLE UNITÉ DE QUANTITÉ DE RAYONS X, en collaboration avec le Prof. H. Bordier. — *Congrès de l'AFAS.*, Lyon 1906, et *Bull. Ass. Doct. Pharm.*, t. V, p. 115, 1906.
  22. UN RÉACTIF INDICATEUR NOUVEAU, DÉRIVÉ DE LA TYROSINE, en collaboration avec M. H. Chavassieu. — *Congrès de l'AFAS.*, Lyon 1906.
  23. SUR LA GENÈSE DE MATIÈRES PROTÉIQUES PAR UN MICROBE PATHOGÈNE DANS DES MILIEUX CHIMIQUEMENT DÉFINIS, en collaboration avec M. L. Lacomme. — *C. R. Acad. Sc.*, 24 déc. 1906.
  24. CULTURES MICROBIENNES EN MILIEUX GLYCOCOLLÉS, en collaboration avec M. L. Lacomme. — *Bull. Ass. Doct. Pharm.*, t. V, p. 279, 1906.
-

## INTRODUCTION

---

Le point de départ de notre travail est dans une communication faite à l'Académie des Sciences par M. CH. LEPIERRE, professeur à l'Université de Coimbra (Portugal); dans cette note, l'auteur pose en principe que les milieux chimiquement définis devant servir à la culture des microbes doivent plutôt être pris parmi ceux qui dérivent de l'hydrolyse des albumines que parmi tout autre produit chimique, et il donne les résultats de ses expériences relatives aux glucoprotéines  $\alpha$ .

Ultérieurement le même auteur a publié un nouveau mémoire sur le même sujet, puis un de nos amis, le docteur ARMENGAUD, reprenant, en 1905, quelques-unes des expériences de Lepierre, a confirmé les résultats obtenus.

Or les *glucoprotéines* ne sont pas les seuls produits de dédoublement des matières albuminoïdes; à côté d'eux, SCHUTZENBERGER a isolé des acides aminés dont le nombre et la nomenclature vont s'augmentant de jour en jour avec les travaux de FISCHER, KOSSEL, HUGOUNENQ et leurs élèves; n'y aurait-il pas avantage pour la culture des microbes à employer des *acides aminés*: glycocolle, leucine, tyrosine, arginine, etc., etc., qui,

eux aussi, dérivent de ces mêmes albuminoïdes mais qui sont mieux définis et moins complexes que ne le sont les glucoprotéines?

Deux questions se sont posées; la première est celle-ci : les glucoprotéines de Schutzenberger, de même que celles de Lepierre, sont-elles bien des corps définis, dépourvus complètement de traces d'albuminoïdes? Ces composés ont-ils bien la formule assignée par leurs auteurs  $C^nH^{2n}N^2O^4$  (n variant de 6 à 11)? La deuxième question a trait aux acides aminés eux-mêmes : les microbes poussent-ils en ces milieux? Si les microbes pathogènes poussent dans des milieux chimiquement définis ne contenant que des acides aminés comme matières azotées, les toxines sont-elles aussi facilement secrétées? Peuvent-elles être isolées? Quelle est leur nature et leur composition?

Tels sont les différents problèmes que nous nous sommes posés : le travail que nous présentons aujourd'hui est très incomplet, il ne fait qu'esquisser quelques grandes lignes, mais nous pensons que c'est dans cette voie qu'il faut chercher l'étude des sécrétions chimiques microbiennes, et s'il peut servir à quelques chercheurs, notre but sera atteint.

Mais avant d'aborder l'exposé de notre sujet, nous considérons comme un devoir de remercier M. le professeur Hugounenq, doyen de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon, qui depuis cinq années nous a accueilli dans son laboratoire et a bien voulu nous nommer son préparateur. Nous lui

savons gré d'avoir développé en nous, par ses cours magistraux et surtout en travaillant constamment avec lui le goût des études biologiques, nous le remercions aussi d'avoir bien voulu nous associer parfois à ses recherches. Que M. le professeur Hugounenq nous permette de lui témoigner notre plus profonde reconnaissance.

A côté de lui, j'ai su apprécier mon excellent ami, M. le professeur agrégé Albert Morel, je le remercie sincèrement de son amitié et de sa précieuse collaboration qui ne s'est jamais démentie.

Je remercie M. le professeur Jules Courmont d'avoir bien voulu m'ouvrir les portes de son laboratoire et mettre à ma disposition toutes les ressources dont il pouvait disposer.

Le docteur Lacomme connaît, lui aussi, et depuis longtemps, la solide amitié qui nous unit; si parfois de légères querelles, dues à son bruyant caractère, se sont glissées entre nous, elles ne nous ont pas empêché de travailler ensemble et n'ont pu que resserrer les liens qui nous unissent depuis le collège.

J'ai divisé cette étude en deux parties. Dans la première, j'étudierai la nature des bouillons de culture, dits chimiquement définis, et je donnerai la composition des glucoprotéines de SCHUTZENBERGER et de LEPIERRE d'après les derniers travaux de MM. HUGOUNENQ et MOREL, de MM. MOREL, LACOMME et GALIMARD.

Je montrerai que si LEPIERRE et ARMENGAUD ont eu des résultats, c'est grâce à la présence des acides

aminés et de substances non encore chimiquement définies, probablement des polypeptides; que les glucoprotéines de LEPIERRE ne sont pas identiques à celles de SCHUTZENBERGER et ne sont que des mélanges d'acides aminés souillés d'impuretés.

Dans la deuxième partie, j'étudierai succinctement les acides aminés provenant de l'hydrolyse des matières albuminoïdes, leurs préparations, leurs propriétés. Je donnerai la composition des milieux qui nous ont servi pour nos expériences, les microbes qui y poussent; j'étudierai la nature chimique de quelques produits fabriqués par des microbes en milieux chimiquement définis, en milieux où n'entrent ni peptones, ni albumines, mais des corps azotés définis tels que l'urée (OUCHINSKY), l'asparagine (ARNAUD et CHARRIN), le glycocolle, etc.

---

## PREMIÈRE PARTIE

---

### **Les milieux de culture chimiquement définis.**

---

#### CHAPITRE PREMIER

#### HISTORIQUE

La question des milieux de culture chimiquement définis n'est pas nouvelle et les premières recherches faites à ce sujet datent du commencement du XIX<sup>e</sup> siècle.

Quoique nous en soyons toujours à une période de tâtonnement, on peut diviser le temps écoulé en deux : une première période comprenant les expériences de BINEAU, BÉCHAMP, PASTEUR, RAULIN, etc..., où les milieux employés, plus ou moins définis, servent à la culture plutôt de végétaux inférieurs que de microbes proprement dits ; et une deuxième période comprenant les expériences d'ARNAUD et CHARRIN, OUCHINSKY, ESCHERICH, LEPIERRE, etc..., où les milieux de culture permettent l'étude des microbes pathogènes.

Nous allons passer rapidement en revue ces différents milieux, en nous attachant spécialement à ceux qui peuvent servir à la culture des microbes pathogènes.

### Première période.

« La question des milieux de culture chimiquement  
« définis, d'un si haut intérêt en bactériologie, a son  
« origine dans les recherches des biologistes, qui, avant  
« la découverte des microbes, avaient étudié le développement des organismes inférieurs dans un milieu  
« artificiel formé d'élément chimiquement définis. »

En effet MORREN, BINEAU, BÉCHAMP (9)<sup>1</sup>, PASTEUR (67) étudièrent des algues, des moisissures, des levures qu'ils cultivaient dans des milieux où n'entraient que des sels minéraux, du sucre, mais pas de matières albuminoïdes.

PASTEUR prouva qu'on pouvait cultiver les végétaux microscopiques et les ferments, dans des milieux artificiels formés de sels minéraux purs, mais ne réussit pas à cultiver les microbes dans ces mêmes milieux; il se servit alors de bouillons de viande.

JODIN (47) remplaça le sucre, hydrate de carbone dont se servait PASTEUR, par la glycérine, l'acide succinique, l'acide acétique, l'acide oxalique; VAN TIEGHEM (80) substitua le tannin; ADOLPH MAYER (61) étudia le développement de la levure de bière dans un milieu mieux défini. Jusqu'ici les derniers auteurs cités employaient comme sels minéraux les cendres de levure, cendres à composition variable; MAYER les remplaça par des sels minéraux définis et contenus dans ces cendres,

---

(1) Les chiffres entre parenthèses renvoient à la bibliographie.

c'est, somme toute, le premier milieu de culture chimiquement défini que nous rencontrions.

Voici la composition du *Milieu de Mayer* :

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| Eau distillée.....                 | 100 gr. |
| Sucre candi.....                   | 10      |
| Tartrate d'ammoniaque.....         | 1       |
| Phosphate de potasse.....          | 0,5     |
| Sulfate de magnésie.....           | 0,5     |
| Phosphate de chaux tribasique..... | 0,5     |

ce milieu est excellent pour la levure de bière, mais ne peut servir aux microbes.

RAULIN (72) fit faire un grand pas à cette question et étudia le développement des Mucédinées dans des milieux où n'entraient pas d'albuminoïdes, où l'azote était à l'état de sels ammoniacaux.

Jusqu'à cette époque (1872), les milieux étudiés, n'ont servi qu'à la culture de végétaux inférieurs, et il faut arriver aux expériences de COHN, c'est-à-dire à la deuxième période.

### Deuxième période.

COHN (12), professeur à Breslau, fut le premier auteur qui ait appliqué les milieux chimiquement définis à la culture des microbes; il remarqua aussi que le sucre était inutile à leur nutrition. Son liquide avait la composition suivante :

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Eau distillée.....         | 100 gr. |
| Tartrate d'ammoniaque..... | 1       |
| Phosphate de potasse.....  | 0,5     |
| Sulfate de magnésie.....   | 0,5     |
| Phosphate tricalcique..... | 0,05    |

l'azote étant fourni par l'ammoniaque, le carbone par l'acide tartrique.

Dans ce milieu, COHN cultiva le *Bacterium termo*, le *Bacillus subtilis*, le *Micrococcus crepusculum* et des *Zooglées*. Il en conclut que ces microbes peuvent, comme les plantes vertes et à l'inverse des animaux, assimiler l'azote sous forme de sels ammoniacaux, mais qu'ils sont impuissants à emprunter le carbone à l'acide carbonique.

C'est donc lui qui, le premier, montra que les microbes n'avaient pas besoin de matières albuminoïdes et qu'on pouvait les cultiver en milieux chimiquement définis.

NÖGELI (63) étudia sous quelle forme, l'azote et le carbone étaient le mieux absorbés et fit une série de solutions nutritives, dont deux peuvent être classées parmi les milieux chimiquement définis :

La première est exclusivement minérale et ressemble au liquide de Cohn, le phosphate tricalcique est remplacé par du chlorure de calcium ;

La seconde est composée de sucre et des mêmes éléments minéraux (tartrate d'ammoniaque, phosphate de potasse, sulfate de magnésie, chlorure de calcium, eau).

HUEPPE (37) objecta que, dans ces liquides à réaction alcaline, une partie de l'acide phosphorique devait se neutraliser, de sorte que ces solutions n'avaient pas, en définitive, la composition exacte indiquée par la formule. Cela est vrai, mais pour nous un milieu chimiquement défini en bactériologie est un milieu où les corps azotés et carbonés sont définis ; il est possible, il

est même certain que les sels minéraux changent non seulement au cours de la préparation du milieu, mais au cours de la stérilisation à 100, 120, 150 degrés, le phosphate de potasse et le chlorure de calcium donnent par exemple du phosphate de chaux et du chlorure de potassium. HUEPPE a raison de dire que les milieux de Nœgeli ne sont pas définis au sens propre du mot : mais, par rapport aux sels minéraux, comme il ne nous semble pas que ceux-ci restent tels surtout pendant la stérilisation, aucun milieu ne pourrait porter ce nom. Je reviendrai d'ailleurs sur cette question.

FERMI (18) a cultivé le *Bacille pyocyannique*, le *Micrococcus prodigiosus* et d'autres microorganismes dans le milieu de Nœgeli additionné de glycérine. Cet auteur constata que ces microbes produisent des ferments (c'est-à-dire des corps albuminoïdes) dans un milieu dépourvu d'albumine.

Jusqu'ici, en fait de microbes pathogènes, il n'y a que le *Bacille pyocyannique* qui ait donné des résultats positifs, les autres ont des exigences plus grandes que les microbes non pathogènes, car nous voyons les microbes de Winogradsky, par exemple, pousser très bien dans des milieux purement minéraux (LACOMME) (56).

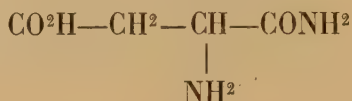
ARNAUD et CHARRIN (6) étudièrent la végétation du *Bacille pyocyannique* dans un milieu bien défini : c'est avec ces auteurs que l'on voit réellement la possibilité de cultiver des microbes pathogènes en milieu chimiquement défini. ARNAUD et CHARRIN composèrent ainsi leur milieu :

Phosphate monopotassique  $\text{PO}_4\text{KH}^2$  . . . 0 gr.4

Phosphate disodique  $\text{PO}_4\text{Na}^2\text{H} + 12\text{H}^2\text{O}$  10 . . . 4

|                                                               |                     |
|---------------------------------------------------------------|---------------------|
| Bicarbonate de potasse $\text{CO}^3\text{KH}$ .....           | 0,134               |
| Chlorure de calcium $\text{CaCl}^2$ .....                     | 0,05                |
| Sulfate de magnésie $\text{MgSO}^4 + 7\text{H}^2\text{O}$ ... | 0,05                |
| Asparagine cristallisée.....                                  | 5                   |
| Eau.....                                                      | q. s. pour 1000 cc. |

l'azote étant fourni par l'*asparagine*



corps possédant les fonctions acide, amide et amine. Ce milieu est bien un milieu chimiquement défini, mais seul le *bacille pyocyannique* y végète bien, nous verrons dans quelles conditions.

OUCHINSKY (65) a pu obtenir, par des cultures en milieu dépourvu d'albumine, des sécrétions microbiennes donnant les réactions des matières albuminoïdes. Son liquide est une modification du liquide de Nægeli :

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| Eau ...                     | 1000 gr. |
| Glycérine.....              | 40       |
| Chlorure de sodium....      | 7        |
| Chlorure de calcium.....    | 0,1      |
| Sulfate de magnésie.....    | 0,2      |
| Biphosphate de potasse..... | 2        |
| Lactate d'ammoniaque.....   | 7        |
| Asparaginate de soude.....  | 3,4      |

les proportions de glycérine, chlorures de sodium et de calcium, sulfate de magnésie, etc., pouvant varier. Primitivement OUCHINSKY n'employait pas l'asparaginate de soude, seul le lactate d'ammoniaque était le corps azoté, ce qui lui donnait de mauvais résultats.

Il ajouta parfois de l'acide urique (0,3 %), de l'urée (0,5 %), du sucre (0,5 %) suivant les microbes qu'il voulait étudier.

D'après cet auteur la plupart des bacilles, sauf le bacille d'Eberth et celui de la tuberculose, poussent dans son milieu. Il conclut que les microbes pathogènes peuvent être cultivés dans des milieux privés d'albumine ; qu'ils y restent virulents et capables de fabriquer des toxines ; que celles-ci appartiennent à la classe des corps protéiques (albumoses ou peptones) ; que les microbes les forment par synthèse ; qu'elles sont élaborées dans le corps même des bactéries et qu'elles ne résultent pas de la décomposition du milieu nutritif.

Les expériences d'OUCHINSKY résolvaient donc le problème des cultures en milieux chimiquement définis, elles étaient très probantes.

Malheureusement une série d'expérimentateurs ne confirmèrent pas ses résultats ; MM. HUGOUNENQ et DOYON (41) n'ont pas réussi à cultiver le *bacille de la diphtérie* et le *bacille du choléra* dans ce milieu et concluent que les résultats d'OUCHINSKY doivent être considérés comme des exceptions, du moins pour la diphtérie qui ne donne aucun résultat même dans ce même milieu peptoné, le *bacille du choléra* y pousse également très mal (42). Les tentatives faites par d'autres expérimentateurs, MM. NICOLAS et DREYFUS, sont aussi restées infructueuses.

En ce qui concerne le *tétanos*, FERMI et PEROSI (49) nient la possibilité de produire la toxine tétanique dans les milieux d'Ouchinsky. LEPIERRE (59) n'a pas

été plus heureux et a vu que la plupart des microbes, sauf le *bacille pyocyanique* dont l'exigence est très faible, ne se développaient pas dans ce liquide. D'autres critiques ont été faites au bactériologiste russe, entre autres sa méthode d'ensemencement en partant de cultures en bouillon.

Depuis, on a donné d'autres formules de bouillon : DUFLOCQ, LEJEUNE et BERTRAND (14) ont utilisé l'eau de mer plus ou moins modifiée comme milieu de culture. Ce milieu, est-il chimiquement défini et exempt de matières albuminoïdes ? Je ne le crois pas : le professeur A. GAUTIER (31) ayant montré, par exemple, que l'iode de l'eau de mer était à l'état organique (2 mmg 40 ‰), à l'état azoté, à moins d'être puisée à de grandes profondeurs où elle contient alors de l'iode à l'état minéral.

FRÄNKEL, ESCHERICH... proposèrent aussi certains milieux, mais les microbes pathogènes ne s'y développent pas ou très mal.

C'est en 1901 que LEPIERRE (58) proposa un nouveau milieu, dans lequel l'élément azoté était formé par des glucoprotéines  $\alpha$ . Dans un mémoire (59), cet auteur explique pourquoi il a été conduit à choisir ces composés organiques complexes :

« J'ai été conduit à la solution du problème, dans le sens le plus large du mot, non par hasard, mais à la suite de considérations théoriques. Les travaux de M. Armand Gautier nous ont appris quels sont les termes successifs de la régression, dans l'organisme, des substances protéiques, de l'albumine primitive à l'urée. Mais la préparation en grand de ces leucomaïnes et

uréides plus ou moins complexes, pour les nécessités des cultures microbiennes, est fort longue, et j'ai de plus observé que les milieux de cultures ainsi obtenus n'avaient qu'une faible valeur nutritive. C'est alors que j'ai eu l'idée de recourir aux *produits de dédoublement des substances albuminoïdes par les alcalis* selon la méthode de mon regretté maître Schützenberger. »

Le point de départ de LEPIERRE est excellent, mais où il fait erreur, c'est en prenant les glucoprotéines  $\alpha$  pour des corps bien définis. Nous y reviendrons dans le chapitre II en étudiant de près la préparation et la composition des glucoprotéines de SCHUTZENBERGER et de LEPIERRE.

Quoi qu'il en soit, ce bactériologiste fit les milieux suivants :

#### FORMULE A.

|                                                                |                                        |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Glucoprotéine pure (de C <sup>6</sup> à C <sup>11</sup> )..... | 1 gr.5 à 3 gr.0                        |
| Constante<br>minérale                                          | { Chlorure de sodium..... 0,5          |
|                                                                | { Sulfate de magnésium..... 0,05       |
|                                                                | { Glycérophosphate de chaux. 0,2 à 0,3 |
|                                                                | { Bicarbonate de potasse.... 0,1 à 0,2 |
| Eau.....                                                       | 100 gr.                                |

#### FORMULE B.

|                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| Glucoprotéine pure.....                                   | 2 gr.     |
| Hydrate de carbone soluble ou alcool<br>polyatomique..... | 2 à 3 gr. |
| Constante minérale de la formule A.                       |           |
| Eau.....                                                  | 100 gr.   |

et il appliqua : la formule A à toutes les espèces relativement peu exigeantes, la formule B à la grande majorité des espèces cultivées dans les laboratoires, *y compris certaines espèces considérées comme très exigeantes.*

Avec ces milieux, LEPIERRE obtint les résultats suivants :

1° Microbes qui assimilent l'azote des glucoprotéines, quelle que soit leur teneur en carbone (C<sup>6</sup> à C<sup>11</sup>).

Quatorze espèces pathogènes : *B. typhique*, *B. coli communis*, *Vibron cholérique*, *Staphylocoque pyogène*, *Tétragène*, *B. pyocyanique*, *b. de la morve*, *b. ictéroïde*, *b. viridis* Lesage, *b. typhi murium*, *b. testicularis*, *b. de la maladie du sommeil*, *Oïdium albicans*, *Actinomyces hominis* — Vingt-trois espèces saprophytes : *M. cinabareus*, *m. carneus*, *m. flavus tartigradus*, *m. flavus liquefaciens*, *m. aquatilis*, *m. prodigiosus*, *b. fluorescent* Flügge, *n. liq.*, *b. fluorescent liquef.*, *b. radicosus*, *b. luteus*, *b. ureæ*, *m. vulgatus*, *Proteus vulgaris*, *b. megaterium*, *b. subtilis*, *b. syncyaneus*, *Sarcina alba*, *s. pulchra*, *Cladothrix alba*, *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum*, *levure de vin*, *levure rose*.

2° Microbes qui assimilent surtout l'azote de certaines glucoprotéines :

Sept espèces pathogènes : *streptocoque*, *b. diphtérique*, *b. du charbon*, *b. de la peste* (Djeddah et Porto), *b. du tétanos*, *vibron septique* poussent très bien dans les glucoprotéines en C<sup>8</sup> et C<sup>9</sup>. Le *bacille de la tuberculose humaine* préfère les glucoprotéines en C<sup>10</sup> et C<sup>11</sup>. Enfin le *méningocoque* exige une adaptation préalable.

Tels sont les résultats obtenus par M. CH. LEPIERRE en 1903. LACOMME et MOREL, puis ARMENGAUD vinrent les confirmer.

Les deux premiers auteurs, dans une courte note à la Société médicale des hôpitaux de Lyon (57), montrent l'avantage des milieux de LEPIERRE et formulent même l'espoir d'obtenir des glucoprotéines synthétiques.

ARMENGAUD, après avoir étudié les glucoprotéines  $\alpha$  (5) comme composés chimiquement définis, donne une série de conclusions dont la principale est celle-ci :

« Les expériences que nous avons entreprises confirment en principe les résultats de LEPIERRE. Parmi les microbes pathogènes que nous avons étudiés, le *b. pyocyanique*, le *b. de la diphtérie*, et le *b. du charbon* nous ont donné des cultures positives dans les milieux à base de glucoprotéine  $\alpha$  en C<sup>9</sup>. Seul le *b. du choléra* n'a pas végété dans ces mêmes milieux.

Cette question demande donc encore à être approfondie. »

Tels sont, succinctement résumés, les résultats des expériences de LEPIERRE, LACOMME et MOREL, ARMENGAUD ; or, comme je le disais dans l'introduction de ce mémoire : est-ce que les glucoprotéines  $\alpha$  sont bien des corps définis ? *Non*, ce sont des mélanges de corps azotés plus ou moins voisins les uns des autres, et souillés d'impuretés.

Les milieux de Lepierre n'étant pas chimiquement définis, de ce fait, que je vais d'ailleurs expliquer dans le chapitre suivant, il faut les rayer des milieux dits « chimiquement définis ».

Quels sont donc actuellement les milieux qui peuvent porter ce nom ? (en temps que milieux pouvant servir à la culture de microbes pathogènes).

Ce sont :

1° *Le milieu de Cohn-Nægeli* où FERMI cultiva le *b. pyocyannique*.

2° *Le milieu d'Arnaud et Charrin* où ces auteurs cultivèrent le même bacille.

3° *Le milieu d'Ouchinsky* avec les différents points d'interrogation suscités par les travaux d'HUGOUNEQ et DOYON, FERMI et PEROSI, LEPIERRE, etc.

Nous sommes donc à une période de tâtonnement, et il faudrait arriver, pour chaque microbe, à connaître la composition définie d'un milieu non albuminoïde, où il serait apte à végéter et à être cultivé comme le *b. pyocyannique* l'est dans le milieu Arnaud et Charrin.

---

## CHAPITRE II

---

### LES GLUCOPROTÉINES

Les glucoprotéines sont des produits du dédoublement des matières albuminoïdes par les alcalis; elles ont été obtenues pour la première fois par SCHUTZENBERGER (77) en hydrolysant l'albumine de l'œuf par la baryte à  $+100^{\circ}$ .

Je n'entrerai pas dans les détails sur la constitution des substances albuminoïdes par SCHUTZENBERGER, je renvoie le lecteur au mémorable travail de ce savant, mais, je dirai en quelques mots comment il a obtenu les glucoprotéines qui nous intéressent.

Les albuminoïdes soumis à l'action de la baryte hydratée au bain d'huile à  $200^{\circ}$  absorbent en s'hydratant 17,9 % d'eau (A. Gautier) et donnent de l'ammoniaque, de l'acide carbonique, de l'acide oxalique, de l'acide acétique, de la tyrosine (3,5 %) et un résidu fixe (94,5 %).

La composition de ce résidu fixe varie suivant que l'on a opéré à  $100^{\circ}$  ou  $200^{\circ}$  :

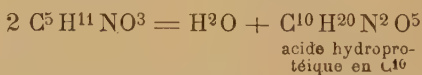
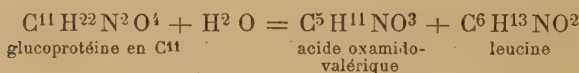
a) Dans l'attaque à  $+100^{\circ}$ , il est formé de tyrosine (3,5 %), de *glucoprotéines*  $\alpha$  (75 %), de dileucéines (15 à 20 %), de traces de leucinimide.

b) Dans l'attaque à  $+ 200^{\circ}$ , il est formé de tyrosine (3,5 %), de leucines (30 à 35 %), de *glucoprotéines*  $\beta$ , d'acides hydroprotéiques, d'acides protéiques.

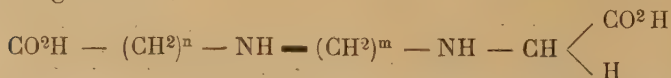
A  $200^{\circ}$  les glucoprotéines  $\alpha$  se sont dédoublées et ont donné des leucines en  $C^n H^{2n+1} NO^2$  et des acides hydroprotéiques en  $C^m H^{2m} N^2 O^5$ ; les dileucéines se sont aussi dédoublées en acides protéiques  $C^n H^{2n-2} N^2 O^4$  et glucoprotéines  $\beta$  non dédoublables par la chaleur.

SCHUTZENBERGER analysa et fixa la formule des glucoprotéines  $\alpha$  et  $\beta$ , il leur donna ce nom en raison de leur saveur sucrée et pour rappeler leur origine protéique; leur formule générale est  $C^n H^{2n} N^2 O^4$  (n variant de 6 à 12).

Les glucoprotéines  $\alpha$ , se formant dans le dédoublement des matières albuminoïdes sous l'action de la baryte à  $100^{\circ}$ , sont bien les génératrices d'acides hydroprotéiques et de leucines (sous ce nom une série d'acides aminés étant désignés : leucine, acide amino-valérique, alanine...)

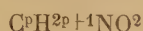


Aussi a-t-on pu donner aux glucoprotéines  $\alpha$  la formule générale :



en s'hydratant, le dédoublement se produit au trait fort

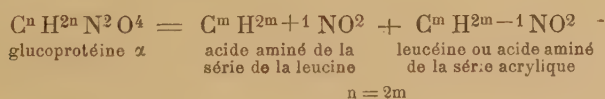
— entre N et C, de sorte que l'addition de  $H^2O$  les double en leucine et en un acide lactamidique



Les leucéines accompagnent donc les leucines dans les produits de l'hydratation des albuminoïdes sous l'influence de l'eau de baryte, et BLEUNARD (28) a pu dire que les glucoprotéines résultent de l'union de deux molécules d'une leucine et de une molécule de leucéine avec perte d'une molécule d'eau.

SCHUTZENBERGER proposa de donner le nom générique de *leucines* aux composés aminés de la série grasse, homologues de la leucine  $C^6H^{13}NO^3$  et celui de *leucéines* à des substances qui peuvent être envisagées comme des acides aminés de la série acrylique.

En résumé, nous voyons que sous l'action de la baryte à  $+100^\circ$ , SCHUTZENBERGER a obtenu entre autres produits des glucoprotéines  $\alpha$  qu'il a pu dédoubler en deux sortes de corps appartenant aux deux séries  $C^nH^{2n+1}NO^2$  (série de la leucine) et  $C^mH^{2m-1}NO^2$  (série des leucéines), à ce moment-là les glucoprotéines apparaissent donc déjà comme une soudure d'acides aminés



mais les travaux ultérieurs à ceux de SCHUTZENBERGER sont venus montrer qu'il y avait une série plus grande de composés aminés dans les matières albuminoïdes et que des divergences profondes existaient dans les produits obtenus et les interprétations des chimistes.

Ainsi SCHUTZENBERGER (78) signale dans l'hydrolyse barytique de l'ovalbumine : des leucines, leucéines, glucoprotéines  $\alpha$ , tyroleucine, un corps vitreux amorphe, tandis qu'ABDERHALDEN et PREGI (1) retirent de la même albumine : de l'alanine, de la leucine, de la proline, des acides aspartique et glutamique, de la phénylalanine, de la tyrosine.

Aussi E. FISCHER (21) s'était exprimé ainsi dès 1901, sur les travaux de SCHUTZENBERGER :

« Schützenberger a sans doute le mérite d'avoir  
« montré que le nombre des acides aminés qu'on peut  
« obtenir des protéines est plus grand qu'on le croyait  
« avant lui ; mais en remarquant la peine énorme qu'il  
« a eue pour isoler ses produits, on est convaincu que  
« sa méthode de séparation est incomplète, il s'est  
« efforcé de séparer les acides aminés par cristallisa-  
« tion dans l'eau et l'alcool, ce qui est un procédé in-  
« suffisant de séparation de ces corps qui donnent si  
« fréquemment des cristallisations mélangées. C'est  
« pourquoi la plupart des produits analysés par Schüt-  
« zenberger semblent être des mélanges et ses résultats  
« sur la présence des différents acides aminés dans les  
« albumines doivent être soumis à la vérification. »

C'est ce qui a porté MM. HUGOUNENQ et MOREL (44) à établir la correspondance qui existe entre les résultats de SCHUTZENBERGER et ceux de FISCHER, ABDERHALDEN, et leurs élèves. Ils ont étudié les corps azotés obtenus et que SCHUTZENBERGER avait groupé en plusieurs catégories sous les noms de *leucines*, *leucéines*, *glucoprotéines*, *corps vitreux amorphe*.

Pour cela, ils ont repris cette question avec les nou-

velles méthodes, permettant de récupérer et d'isoler les composés mono et diaminés fournis par l'hydrolyse régulière des matières albuminoïdes.

A. — Etude des glucoprotéines de P. Schützenberger.

MM. HUGOUNENQ et MOREL (45) attaquèrent 1 k. 782 d'albumine sèche par 8 k. de baryte et 6 k. d'eau à la température de l'ébullition et pendant 72 heures. Après refroidissement et élimination de la baryte par l'acide sulfurique, évaporation au bain-marie jusqu'à cristallisation, ils obtinrent des cristaux A et des eaux mères B.

Les cristaux A essorés et épuisés par l'alcool à 92° bouillant donnèrent un résidu insoluble constitué par les *leucines* de SCHUTZENBERGER, la solution alcoolique concentrée donna des cristaux constitués par des *leucéines*.

Les eaux mères B additionnées d'alcool à 92° bouillant donnèrent naissance à des cristaux constitués par des *leucines*, la solution mère alcoolique concentrée laissa déposer des *glucoprotéines*.

Les solutions alcooliques de A et B débarrassées d'alcool ont fourni une colle précipitable par l'éther, c'est le *corps vitreux amorphe* de SCHUTZENBERGER.

Finalement HUGOUNENQ et MOREL obtinrent :

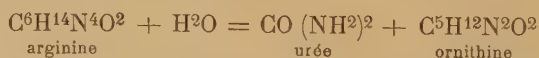
|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| 1° Leucines .....              | 350 gr. |
| 2° Leucéines .....             | 350 »   |
| 3° Glucoprotéines .....        | 173 »   |
| 4° Corps vitreux amorphe ..... | 302 »   |

et soumirent *séparément* ces quatre fractions à un traitement approprié.

Chacun de ces groupes dissous dans l'eau a été additionné d'acide phosphotungstique en solution saturée à froid et contenant 10 % d'acide sulfurique : un *précipité floconneux* amorphe se forme et on arrête l'addition d'acide phosphotungstique quand le précipité devient *granuleux*.

a) Le *précipité floconneux* a été décomposé par la baryte, celle-ci éliminée par l'acide carbonique, le liquide est évaporé après filtration et le résidu, repris par l'eau, donne des « colles » incristallisables ayant beaucoup de caractères communs avec les polypeptides naturelles de FISCHER, BERGELL, ABDERHALDEN, etc..... Ces colles hydrolysées de nouveau ont pu être étudiées comme le reste.

b) Les eaux mères de ce précipité floconneux saturées d'acide phosphotungstique donnent un *précipité granuleux* cristallin qui est traité comme le précédent par la baryte et l'acide carbonique; HUGOUNENQ et MOREL traitèrent alors le résidu, suivant la méthode de KOSSEL et KUTSCHER (52) pour la recherche des acides diaminés, par le sulfate d'argent et la baryte, ils obtinrent un précipité argentique qui, faible, leur donnèrent des traces douteuses d'histidine; il ne pouvait y avoir d'arginine puisque celle-ci, sous l'action de la baryte à chaud, s'est dédoublée en urée et acide  $\alpha$   $\delta$  diamino-valérique :



Les eaux mères du précipité argentique débarrassées de l'argent par  $\text{H}_2\text{S}$ , puis précipitées par l'acide phosphotungstique, donnaient des phosphotungstates inso-

lubles; ceux-ci décomposés par la baryte et évaporés laissèrent un résidu qui, additionné d'alcool absolu et d'acide picrique, sans excès, donna un précipité formé en majeure partie de picrate de lysine.

Les eaux mères et alcool mères sont débarrassés d'acide picrique par addition d'acide chlorhydrique et agitation avec de l'éther, puis précipitées de nouveau par l'acide phosphotungstique, traitées par la baryte et l'acide carbonique comme précédemment. Au moyen du chlorure de benzoyle et de la soude, de la benzoylornithine a pu être isolée et caractérisée.

c) Les eaux mères des précipités floconneux et granuleux sont neutralisées par la baryte et l'acide carbonique, évaporées au bain-marie à consistance sirupeuse. Ce sirop a été éthérifié à trois reprises par l'alcool absolu et l'acide chlorhydrique sec; les chlorures d'éther ont été soumis à l'action ménagée de la soude pour libérer les éthers eux-mêmes et ceux-ci ont été ensuite séparés par distillation fractionnée dans le vide, en 4 groupes :

1° de 50 à 80°, sous 10 à 11  $\text{m/m}$  de pression.

2° de 80 à 100° »

3° de 100 à 110°, sous 1 à 2  $\text{m/m}$  de pression.

4° résidu.

Ces quatre fractions sont saponifiées par la baryte afin d'isoler les acides correspondants. Dans la 1<sup>re</sup> fraction, on rencontre de l'alanine; dans les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup>, de l'alanine, de la leucine, de la proline; dans le résidu, de la phénylalanine, de l'acide glutamique, de l'acide aspartique.

Par ce procédé, HUGOUNENQ et MOREL ont pu étudier

les leucines, leucéines, glucoprotéines et corps vitreux amorphe de SCHUTZENBERGER, et ont retiré (45) :

*Première fraction.* — Leucines 350 gr. :

un faible précipité floconneux phosphotungstique, et un précipité granuleux phosphotungstique, qui ont été joints aux précipités floconneux et granuleux obtenus avec les autres groupes, 34 gr. 7 alanine, 142 gr. 8 leucine, 8 gr. 9 phénylalanine, 3 gr. 2 acide aspartique, 2 gr. 7 acide glutamique, 17 gr. 6 tyrosine.

*Deuxième fraction.* — Leucéines 350 gr. :

un précipité toujours faible floconneux, un précipité granuleux, 73 gr. alanine, 108 gr. leucine, 20 gr. proline, 65 gr. phénylalanine, 16 gr. 6 acide aspartique, 6 gr. 7 acide glutamique.

*Troisième fraction.* — Glucoprotéines  $\alpha$  173 gr. :

un précipité floconneux assez abondant et un précipité granuleux, 22 gr. 4 alanine, 20 gr. 6 leucine, 2 gr. 5 proline, 8 gr. 6 acide aspartique, 20 gr. 1 acide glutamique.

*Quatrième fraction.* — Corps vitreux amorphe 302 gr. :

presque exclusivement composé de substances précipitables par l'acide phosphotungstique.

Les deux sortes de précipités phosphotungstiques ont été étudiés séparément, les précipités granuleux au point de vue diamines, les précipités floconneux au point de vue polypeptides.

1° Les *précipités granuleux* ont donné :

0 gr. 85 d'un corps non déterminé, 11 gr. 7 de picrate

de lysine, 4 gr. 3 d'acide ornithurique ou dibenzoylor-nithine.

2° Les *précipités floconneux* décomposés par la baryte, l'acide carbonique, puis évaporés, ont donné des « colles » incristallisables, solubles dans l'eau et dans l'alcool qu'HUGOUNENQ et MOREL pensent être des corps très voisins des polypeptides naturelles signalées par FISCHER, ABDERHALDEN, PICK, etc..., et qu'ils considèrent comme des produits intermédiaires de la simplification de l'albumine en acides aminés.

Ces « colles » ont été chauffées pendant 12 heures avec 3 fois leur poids d'acide chlorhydrique ( $\Delta = 1.19$ ) et 6 gr. de chlorure d'étain. Ce qui a permis d'isoler :

4 gr. 91 de picrate de lysine, 21 gr. 3 d'alanine, 16 gr. 9 de phénylalanine, 8 gr. 9 d'acide aspartique, 33 gr. 1 d'acide glutamique.

En résumé les auteurs cités retirent des leucines, leucéines, glucoprotéines, une série d'acides mono et diamminés qui, rapportés à 100 gr. d'albumine, donnent :

| ACIDES MONOAMINÉS |        | ACIDES DIAMINÉS |        |
|-------------------|--------|-----------------|--------|
| Alanine .....     | 8.4 %  | Lysine .....    | 0.27 % |
| Leucine .....     | 15.2 » | Ornithine ..... | 0.08 » |
| Proline .....     | 1.2 »  |                 |        |
| Phénylalanine ... | 5.2 »  |                 |        |
| Acide aspartique, | 1.7 »  |                 |        |
| Acide glutamique  | 3.5 »  |                 |        |
| Tyrosine .....    | 0.99 » |                 |        |

et en comparant ces résultats, obtenus par l'hydrolyse alcaline de l'ovalbumine, avec ceux obtenus par l'hydro-

lyse acide de cette même albumine, on voit qu'ils sont, en partie, comparables :

| ACIDES MONOAMINÉS<br>(Abderhalden et Pregl) (1). |        | ACIDES DIAMINÉS<br>(Hugounenq et Galimard) (43). |        |
|--------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------|--------|
| Alanine . . . . .                                | 8.06 % | Lysine . . . . .                                 | 2.15 % |
| Leucine . . . . .                                | 7.1 »  | Arginine . . . . .                               | 2.14 » |
| Proline . . . . .                                | 2.3 »  |                                                  |        |
| Phénylalanine . . .                              | 4.4 »  |                                                  |        |
| Acide aspartique .                               | 1.5 »  |                                                  |        |
| Acide glutamique                                 | 8.0 »  |                                                  |        |
| Tyrosine . . . . .                               | 1.1 »  |                                                  |        |

Cependant l'hydrolyse barytique à  $+100^{\circ}$  semble plus ménagée; les acides diaminés ne peuvent être comparés, car l'arginine est décomposée en urée et acide diamino-valérique et la lysine subit aussi une attaque partielle et dédouble sa molécule.

Nous venons de voir ce que sont les glucoprotéines de SCHUTZENBERGER, d'après les derniers travaux parus; celles de LEPIERRE ne sont pas identiques et ne sont pas constituées de la même façon.

#### B. — Etude des glucoprotéines de Ch. Lepierre.

C'est en essayant de vérifier les résultats obtenus par LEPIERRE que nous nous sommes rendu compte que les produits préparés suivant sa technique et n'ayant subi qu'une ou deux cristallisations permettaient bien la culture des microbes (57); mais en étudiant de plus près la nature de ces glucoprotéines, MOREL, LACOMME et moi (29), nous avons vu que, lorsque, par un grand nombre de cristallisations, elles sont purifiées de toute trace de

tyrosine et de corps non cristallisables, beaucoup d'espèces microbiennes n'y poussaient plus.

Ce fait nous a donné des doutes sur l'exactitude de leur constitution et une analyse chimique approfondie nous a montré que les glucoprotéines  $\alpha$  de LEPIERRE ne répondaient pas à la formule qu'il leur avait assignée : *ce sont des mélanges d'acides monoaminés souillés par de petites quantités de polypeptides et d'acides diamminés incristallisables.*

Avant de donner nos résultats, nous allons voir la technique employée par LEPIERRE (59).

Les matières albuminoïdes qui lui ont servi ont été le muscle et la gélatine :

« On chauffe une partie de ces albuminoïdes, *calculés secs*, avec 2,5 à 3 p. de baryte hydratée pure et 4 p. d'eau. On chauffe le tout dans de grands ballons, en communication avec des réfrigérants ascendants, d'abord au bain-marie, jusqu'à fluidification complète des produits, puis on chauffe à feu direct à la température de l'ébullition (100-102°) que l'on maintient pendant 60 heures environ. Il se dégage de l'ammoniaque et un précipité abondant se forme. On filtre ensuite à chaud, on lave le précipité (formé d'oxalate et de carbonate de baryum) à l'eau bouillante. Au liquide filtré, jaune clair, on ajoute de l'acide sulfurique pur et étendu jusqu'à précipitation complète de toute la baryte libre ou combinée, ce qui est indispensable, le baryum étant nuisible aux microbes; il vaut donc mieux ajouter un petit excès d'acide sulfurique (facile à saturer plus tard avec des sels de sodium ou de potassium) que de laisser du baryum. On filtre pour séparer le sulfate de baryum; on lave le précipité. Tous les liquides obtenus sont évaporés *dans le vide* à 40-45°. L'eau qui distille renferme un peu d'acide acétique, ce qui n'a pour nous aucun intérêt. On obtient ainsi un *résidu fixe* dont le poids est toujours supérieur à celui de l'albuminoïde primitif. Il renferme surtout les

glucoprotéines  $\alpha$   $C^nH^{2n}N^2O^4$  dont  $n$  varie de 6 à 11. Pour séparer ces termes homologues on a recours à l'emploi de l'alcool plus ou moins concentré. Le résidu fixe est donc épuisé par l'alcool à 90° bouillant; on obtient après plusieurs traitements, un résidu A et une solution B. Le résidu A est d'abord privé de tyrosine par un mélange tiède de 1 p. d'alcool et de 3 p. d'eau qui laisse ce corps à l'état insoluble (dans le cas de la gélatine ce traitement est inutile). On filtre pour séparer la tyrosine. On évapore à nouveau dans le vide et on épuise le résidu par l'alcool à 80° G. L.; on a ainsi un résidu A<sub>1</sub> et une solution A<sub>2</sub> qu'il est facile de faire cristalliser. La solution alcoolique B donne le plus souvent, par refroidissement, un abondant dépôt de cristaux que l'on essore à la trompe. Les alcools mères évaporés donnent encore quelquefois des cristaux que l'on réunit aux précédents. On évapore ensuite dans le vide à sec (résidu C); ce résidu est repris par l'alcool absolu bouillant qui quelquefois ne dissout rien ou bien donne un résidu C<sub>1</sub> et une solution qui cristallise (cristaux C<sub>2</sub> et alcools mères D). Il n'y a pas avantage à pousser plus loin le fractionnement sauf pour D qui peut renfermer des dileucéines que l'on sépare par un traitement à l'éther qui ne les dissout pas.»

« Les glucoprotéines varient avec la nature des substances albuminoïdes employées. La plupart cristallisent très facilement. La gélatine fournit surtout les termes en C<sup>6</sup> et C<sup>7</sup> (les cristaux A<sub>1</sub> sont formés par C<sup>6</sup>; A<sub>2</sub> par C<sup>6</sup> + C<sup>7</sup>; les cristaux B par C<sup>7</sup>). L'albumine et le muscle donnent C<sup>8</sup>, C<sup>9</sup>, C<sup>10</sup>, C<sup>11</sup> (cristaux A<sub>1</sub> = C<sup>8</sup>; cristaux A<sub>2</sub> = C<sup>8</sup> + C<sup>9</sup>; cristaux B = C<sup>9</sup>; C<sub>1</sub> = C<sup>10</sup>; cristaux C<sub>2</sub> = C<sup>11</sup>; résidu D = C<sup>11</sup> + dileucéines). »

Or les glucoprotéines  $\alpha$  de LEPIERRE ne correspondent pas exactement aux glucoprotéines  $\alpha$  de SCHUTZENBERGER (78) puisque LEPIERRE ne prend aucun soin de séparer ses cristaux des acides en  $C^nH^{2n+1}NO^2$  que SCHUTZENBERGER avait au préalable enlevé.

Nous avons fait des glucoprotéines  $\alpha$  suivant la tech-

nique de LEPIERRE, en hydrolisant par la baryte 1000 gr. d'ovalbumine sèche. Nous avons retiré ainsi une série de corps  $A_1$ ,  $A_2$ , B,  $C_1$ ,  $C_2$ , D, que nous avons étudiés.<sup>1</sup> Voici les résultats obtenus :

**$A_1$**  —  $C^8H^{16}N^2O^4$  — poids 37 grammes qui ont été dédoublés en traces de polypeptides et de diamines, 6 gr. 6 d'alanine et 15 gr. 6 de leucine :

*Analyses :*

|                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1° Matière.....                 | 0 gr. 2527                      |
| Volume lu.....                  | 34 cmc. 9                       |
| H.....                          | 754 <sup>m</sup> / <sub>m</sub> |
| t.....                          | 14°                             |
| trouvé .....                    | N = 16,1                        |
| calculé pour $C^3H^7NO^2$ ..... | N = 15,7                        |
|                                 | (alanine)                       |

|                                    |                                 |
|------------------------------------|---------------------------------|
| 2° Matière.....                    | 0 gr. 2312                      |
| Volume lu .....                    | 21 cm. 9                        |
| H.....                             | 748 <sup>m</sup> / <sub>m</sub> |
| t.....                             | 16°5                            |
| trouvé .....                       | N = 10,8                        |
| calculé pour $C^6H^{13}NO^2$ ..... | N = 18,68                       |
|                                    | (leucine)                       |

ce qui donne pour  **$A_1$**  : 18 % d'alanine et 42 % de leucine.

**$A_2$**  —  $C^8H^{16}N^2O^4$  — poids 41 gr. qui ont donné des traces de tyrosine et de corps précipitables par l'acide phosphotungstique, 4 gr. 9 d'alanine, 25 gr. de leucine.

---

(1) La technique suivie a été à peu près analogue à celle employée par MM. Hugounenq et Morel pour l'étude des glucoprotéines de Schützenberger, nous n'y reviendrons pas.

*Analyses :*

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| 1° Matière .....                | 0 gr. 2098 |
| Volume lu .....                 | 28 cmc.    |
| II .....                        | 746 m/m    |
| t .....                         | 16°        |
| trouvé .....                    | N = 15,2   |
| calculé pour $C^3H^7NO^2$ ..... | N = 15,7   |
| (alanine)                       |            |

|                                    |             |
|------------------------------------|-------------|
| 2° Matière, .....                  | 0 gr. 2054  |
| CO <sup>2</sup> .....              | 0,4114      |
| H <sup>2</sup> O....               | 0,1886      |
| trouvé .....                       | { C = 54,62 |
|                                    | { H = 10,2  |
| calculé pour $C^6H^{13}NO^2$ ..... | { C = 54,96 |
| (leucine)                          | { H = 9,92  |

ce qui donne pour **A**<sub>2</sub> : 12 % d'alanine et 61 % de leucine.

**B** —  $C^9H^{18}N^2O^4$  — poids 59 grammes qui ont donné des traces de tyrosine et de corps précipitables par l'acide phosphotungstique, 7 gr. 67 d'alanine. 17 gr. 7 de leucine et 6 gr. 5 de phénylalanine.

*Analyses :*

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| 1° Matière .....                | 0 gr. 2451 |
| Volume lu .....                 | 31 cmc.    |
| H .....                         | 756 m/m    |
| t .....                         | 15°        |
| trouvé .....                    | N = 15,2   |
| calculé pour $C^3H^7NO^3$ ..... | N = 15,7   |
| (alanine)                       |            |

|                                                                   |                                 |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 2° Matière.....                                                   | 0 gr. 1832                      |
| VOLUME lu.....                                                    | 18 cmc. 3                       |
| H .....                                                           | 746 <sup>m</sup> / <sub>m</sub> |
| t .....                                                           | 16°                             |
| trouvé .....                                                      | N = 11,4                        |
| calculé pour C <sup>6</sup> H <sup>13</sup> N <sup>3</sup> O..... | N = 10,68                       |
| (leucine)                                                         |                                 |

|                                                                   |             |
|-------------------------------------------------------------------|-------------|
| 3° Matière.....                                                   | 0 gr. 2144  |
| CO <sup>2</sup> .....                                             | 0 5125      |
| H <sup>2</sup> O.....                                             | 0 1345      |
| trouvé .....                                                      | { C = 65,17 |
|                                                                   | { H = 6,95  |
| calculé pour C <sup>9</sup> H <sup>11</sup> NO <sup>2</sup> . . . | { C = 65,41 |
| (phénylalanine)                                                   | { H = 6,71  |

ce qui donne pour **B** : 13 % d'alanine, 30 % de leucine et 11 % de phénylalanine.

**C<sub>1</sub>** — C<sup>10</sup>H<sup>20</sup>N<sup>2</sup>O<sup>4</sup> — poids 21 gr. qui ont donné des traces de tyrosine et de corps précipitables par l'acide phosphotungstique, 4 gr. 3 d'alanine fondant à 293° (non analysé) et 7 gr. 4 de leucine.

*Analyse :*

|                                                                   |             |
|-------------------------------------------------------------------|-------------|
| Matière.....                                                      | 0 gr. 2560  |
| CO <sup>2</sup> .....                                             | 0 5127      |
| H <sup>2</sup> O.....                                             | 0 2262      |
| trouvé.....                                                       | { C = 54,6  |
|                                                                   | { H = 9,81  |
| calculé pour C <sup>6</sup> H <sup>13</sup> NO <sup>3</sup> . . . | { C = 54,96 |
| (leucine)                                                         | { H = 9,92  |

ce qui donne pour **C<sub>1</sub>** : 16 % d'alanine et 35 % de leucine.

$\mathbf{C}_2$  —  $\mathbf{C}^{11}\mathbf{H}^{22}\mathbf{N}^2\mathbf{O}^4$  — poids 33 gr. qui ont donné de la tyrosine et des corps précipitables par l'acide phosphotungstique, 2 gr. 7 d'alanine fondant à  $293^\circ$  (non analysé), 9 gr. 6 de leucine, 5 gr. de phénylalanine.

*Analyses :*

|                                                               |                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1° Matière.....                                               | 0 gr 1936                                                                          |
| CO <sup>2</sup> .....                                         | 0,3875                                                                             |
| H <sup>2</sup> O .....                                        | 0,1760                                                                             |
| trouvé.....                                                   | $\left\{ \begin{array}{l} \text{C} = 54,6 \\ \text{H} = 10,1 \end{array} \right.$  |
| calculé pour $\mathbf{C}^6\mathbf{H}^{13}\mathbf{NO}^2$ ..... |                                                                                    |
| (leucine)                                                     | $\left\{ \begin{array}{l} \text{C} = 54,96 \\ \text{H} = 9,92 \end{array} \right.$ |
| 2° Matière.....                                               | 0 gr 2132                                                                          |
| CO <sup>2</sup> .....                                         | 0,5092                                                                             |
| H <sup>2</sup> O.....                                         | 0,1288                                                                             |
| trouvé.....                                                   | $\left\{ \begin{array}{l} \text{C} = 65,23 \\ \text{H} = 6,62 \end{array} \right.$ |
| calculé pour $\mathbf{C}^9\mathbf{H}^{11}\mathbf{NO}^2$ ..... |                                                                                    |
| (phénylalanine)                                               | $\left\{ \begin{array}{l} \text{C} = 65,41 \\ \text{H} = 6,71 \end{array} \right.$ |

ce qui donne pour  $\mathbf{C}_2$  : 8 % d'alanine, 29 % de leucine et 15 % de phénylalanine.

LES DILEUCÉINES **D** ont été dissociées en :

1° Polypeptides dédoublables, par l'hydrolyse acide prolongée, en lysine, alanine, proline, acide aspartique, acide glutamique ;

2° Diamines : lysine et ornithine ;

3° Monamines : alanine, leucine, proline, phénylalanine, acide aspartique, acide glutamique et traces de tyrosine.

Comme on le voit, les prétendues glucoprotéines ne

sont pas « des espèces chimiques bien définies » comme le dit LEPIERRE, mais des mélanges d'acides monoaminés, incomplètement débarrassés d'impuretés non cristallisables.

LEPIERRE dit avoir vérifié la pureté des produits qu'il a obtenus et leur composition par un grand nombre d'analyses; l'argument en faveur de l'existence des glucoprotéines, tiré de l'établissement de leur formule par l'analyse, ne prévaut pas contre la séparation de chacun des produits en plusieurs substances. Nous-mêmes avons analysé quelques-unes de ces glucoprotéines en  $C^8$  et  $C^9$ , et, à l'analyse, elles cadraient bien avec la formule générale  $C^nH^{2n}N^2O^4$ . MOREL a obtenu aussi des résultats identiques et ce sont ces mêmes matières que nous avons pourtant dissociées!

LEPIERRE dit aussi avoir déterminé le poids moléculaire, en collaboration avec le D<sup>r</sup> ALVARO BASTOS, par la méthode cryoscopique et se fonde sur les chiffres obtenus pour admettre que les glucoprotéines sont bien des corps chimiquement définis. Or, la détermination du poids moléculaire des prétendues glucoprotéines par la cryoscopie au sein de l'acide acétique (comme le fait LEPIERRE), n'a pas de valeur, puisque les lois de RAOULT sont inapplicables à des mélanges aussi complexes de corps ayant des fonctions, acide et base, dans une même molécule. Les acides aminés ne sont pas cryoscopables dans l'acide acétique, par suite des combinaisons qu'ils donnent, à plus forte raison les glucoprotéines, qui, comme nous venons de le démontrer, sont des mélanges de ces mêmes acides.

En résumé, les glucoprotéines  $\alpha$  de SCHUTZENBERGER, comme celles de LEPIERRE, ne sont pas des corps chimiquement définis mais des mélanges d'acides aminés ; les albumines s'hydrolysent par les alcalis comme par les acides, sauf quelques particularités, telles que la destruction par la baryte de l'arginine, stable en milieu acide ; les dénominations de *leucéines* et de *glucoprotéines* doivent donc disparaître du langage scientifique (44).

Il n'en reste pas moins acquis que ce sont les travaux de SCHUTZENBERGER qui ont ouvert la voie à l'étude rationnelle des corps albuminoïdes, dont les dédoublements et la constitution étaient à peu près complètement inconnus avant lui.

Quant à cultiver les microbes dans de tels milieux, glucoprotéines ou leucéines, cela revient en fait à les cultiver dans des solutions où entrent des mélanges d'acides aminés plus ou moins impurs. C'est l'étude de ces acides aminés retirés des albuminoïdes que nous allons voir maintenant.

---

## DEUXIÈME PARTIE

---

### Les acides aminés comme milieux de culture.

---

#### CHAPITRE PREMIER

C'est toute l'histoire de la composition des albumines, l'étude complète des produits de leur hydrolyse qu'il faudrait faire ici; aussi cela m'entraînerait trop loin et je prie le lecteur de se reporter aux remarquables travaux de E. FISCHER, KOSSEL, ABDERHALDEN, KUTSCHER, et leurs élèves, en Allemagne; d'A. GAUTIER, HUGOUNENQ, et leurs élèves, en France.

##### § I. — Extraction des acides aminés par l'hydrolyse des matières albuminoïdes.

Les techniques des professeurs KOSSEL et KUTSCHER (52), FISCHER (20), légèrement modifiées nous ont permis d'extraire toute une série d'acides aminés. En quelques pages je donnerai les grands traits de ce procédé extrêmement long.

On attaque les matières convenablement isolées des liquides biologiques, par l'acide sulfurique au tiers :

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| Albuminoïde . . . . .      | 1 kilog. |
| Acide sulfurique . . . . . | 3 »      |
| Eau . . . . .              | 6 »      |
| Chlorure de sodium (1) .   | 100 gr.  |

---

(1) L'addition de chlorure de sodium, d'après HART (33), donnant un meilleur rendement en arginine.

On fait bouillir au réfrigérant ascendant pendant quinze ou vingt heures; on obtient finalement une liqueur sulfurique fortement colorée en brun, ne renfermant guère à l'état de produits humiques qu'une fraction de l'azote. Par ce traitement, les albumines sont dédoublées en produits définis, cristallisables, dont on poursuit l'étude après avoir éliminé la majeure partie de l'acide sulfurique par la baryte (39).

Ces produits cristallisables peuvent être séparés en deux groupes, les acides monoaminés et les acides diaminés à l'aide d'un réactif précieux en chimie biologique : l'*acide phosphotungstique*, qui précipite les acides diaminés à l'état de phosphotungstates insolubles et laisse les acides monoaminés à l'état de phosphotungstates solubles.

Le réactif phosphotungstique, que nous employons, a la formule suivante :

|                          |                      |
|--------------------------|----------------------|
| Acide phosphotungstique. | 250 gr.              |
| Acide sulfurique.....    | 50 gr.               |
| Eau distillée .....      | q. s. pour 1000 cme. |

On obtient ainsi une première séparation; d'un côté : l'arginine, l'histidine, la lysine, l'acide  $\alpha$  diaminovalérique, la cystine, à l'état de phosphotungstates insolubles; de l'autre : la leucine, la tyrosine, les acides glutamique et aspartique, le glycocolle, l'alanine, la phénylalanine, la sérine, la valine, la proline, à l'état de phosphotungstates solubles.

#### a) PHOSPHOTUNGSTATES INSOLUBLES (diamines).

Le précipité, séparé des eaux mères, est broyé avec de l'eau de baryte et de la baryte pulvérisée jusqu'à réaction fortement alcaline, on sépare le liquide obtenu du double précipité de phosphotungstate et sulfate de baryte formé, on lave à l'eau distillée. Dans le liquide barytique, on fait passer un courant de  $\text{CO}_2$  jusqu'à réaction acide, on essore; le précipité de carbonate de baryte peut retenir, s'il y en a, l'acide diaminotrioxydodécanoïque

et la cystine. La solution neutre ou légèrement acide est évaporée puis reprise par l'eau et l'acide sulfurique, traitée par le sulfate d'argent en prenant certaines précautions (HUGOV-NENO) (38) ; on sépare de cette façon l'arginine et l'histidine à l'état de combinaisons argentiques. On alcalinise avec de la baryte pulvérisée et on essore, la liqueur contient la lysine, le précipité contient l'arginine et l'histidine à l'état de combinaisons argentiques insolubles en présence d'un excès de baryte. Après reprise par  $\text{SO}^4\text{H}^2$ , on traite par  $\text{H}^2\text{S}$  qui décompose tous ces sels d'argent et met les acides diaminés en liberté.

A. *Arginine et histidine*. — La séparation de ces deux bases s'effectue par l'azotate d'argent et la baryte, l'*histidine* précipite à l'état de combinaison argentobarytique, et on peut la purifier par une des méthodes de KOSSEL et KUTSCHER (52) ou de KOSSEL et PATTEN (53). On obtient ainsi du chlorhydrate d'histidine répondant à la formule



Les eaux mères de l'histidine contenant l'arginine sont traitées par  $\text{SO}^4\text{H}^2 + \text{H}^2\text{S}$ , décolorées au noir de sang, évaporées, puis purifiées, on obtient ainsi de l'*arginine* pure ou plus facilement on en fait le chlorhydrate



B. *Lysine*. — Cette base est quelquefois mélangée à de l'acide diaminovalérique et à de l'urée provenant de la décomposition de l'arginine, comme nous le verrons.

On traite la liqueur par l'acide phosphotungstique qui précipite les diamines et laisse l'urée et des impuretés. On décompose le précipité par la baryte, et après traitements successifs par l'eau et l'acide carbonique on obtient une masse jaune pateuse qui, reprise par l'alcool absolu et l'acide picrique, laisse déposer du picrate de lysine insoluble dans l'alcool absolu ; au bout de 12 heures, on recueille ce picrate sur un filtre, on le lave à l'alcool absolu et on le redissout dans l'eau bouillante ; par refroidissement on obtient de belles aiguilles jaune d'or de *picrate de lysine* :



que l'on peut purifier par une ou deux cristallisations dans l'eau, en sachant que l'eau dissout à froid 0,54 % de ce picrate.

Pour nos milieux de culture, nous transformons le picrate en chlorhydrate. Pour cela, le picrate de lysine est dissous dans l'eau et additionné de 5 % d'acide chlorhydrique, l'acide picrique libre est enlevé par l'éther à 65°; après trois ou quatre reprises, l'éther ne se colore plus, la liqueur aqueuse contient la lysine à l'état de chlorhydrate mélangé d'acide chlorhydrique libre, on la décolore par le noir de sang, on filtre et on évapore à siccité, on reprend par l'eau et on fait cristalliser dans le vide sur l'acide sulfurique et la potasse; on obtient de cette façon du chlorhydrate de lysine



Les eaux mères du picrate de lysine contiennent de l'acide diaminovalérique, s'il y en a, à l'état de picrate ou à l'état d'acide libre. On peut le recueillir soit à l'état de picrate en ajoutant une nouvelle quantité d'acide picrique, soit à l'état d'acide ornithurique après avoir enlevé l'excès d'acide picrique par l'éther et l'acide chlorhydrique et après traitement par le chlorure de benzoyle et la soude.

#### b) PHOSPHOTUNGSTATES SOLUBLES (monamines)

Les diamines étant séparées par l'acide phosphotungstique, les monamines restent dans la solution chargée d'un excès d'acides phosphotungstique et sulfurique, on sature par l'eau de baryte et la baryte pulvérisée, onessore, on lave à l'eau bouillante en excès afin de dissoudre l'aspartate de baryte peu soluble, on enlève l'excès de baryte par l'acide carbonique, on filtre et on évapore.

On concentre jusqu'à apparition d'une croûte cristalline, par refroidissement la majeure partie de la *tyrosine* précipite. On la recueille et on la purifie.

On continue à évaporer tant qu'il se précipite des cristaux donnant la réaction de Millon, ceux-ci sont composés de *tyrosine* et de *leucine*. On les réunit aux précédents et on les dissout

dans l'eau chargée de 10 % de soude caustique, on chauffe à 80° et on filtre, on acidifie par l'acide acétique, par refroidissement la tyrosine cristallise. Les eaux mères sont jointes à la liqueur primitive contenant les autres monamines. On concentre un peu pour avoir une liqueur sirupeuse.

On fait passer un courant d'HCl gazeux jusqu'à refus, on refroidit à - 5° et après huit jours de repos dans la glacière, on observe des cristaux qui peuvent être composés de chlorhydrate d'*acide glutamique* et de chlorure de sodium. Pour pouvoir séparer les cristaux on ajoute de l'alcool et on filtre à la trompe (FISCHER). Le chlorhydrate de l'acide glutamique est dissous dans l'eau bouillante, décoloré au noir de sang et purifié

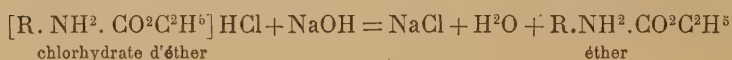


Le liquide chlorhydrique d'où l'on a retiré les cristaux est évaporé sous pression réduite tant qu'il distille quelque chose. On obtient un liquide sirupeux qu'on additionne de trois fois son volume d'alcool, rigoureusement absolu, et on le sature par HCl gazeux sec en suivant la technique de FISCHER (20), c'est-à-dire d'abord à froid, puis à la fin en chauffant légèrement au bain-marie. Comme il y a production d'eau, il faut l'éliminer en distillant la solution alcoolique et chlorhydrique sous 15 mm. de pression au bain-marie à 50° (temp. maximum); le résidu est de nouveau additionné de 2 volumes d'alcool absolu et saturé par HCl gazeux sec, on fait une seconde distillation dans les mêmes conditions, et on fait passer pour la troisième fois le courant d'acide chlorhydrique gazeux. Cette triple opération a pour but d'éthérifier les acides aminés en les transformant en chlorhydrates d'éthers éthyliques.

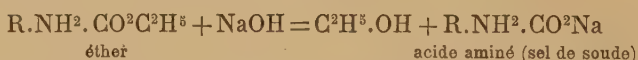


S'il y a beaucoup de *glycocolle*, il est préférable de le séparer à l'état de chlorhydrate d'éthylglycocolle. Pour cela on refroidit le liquide contenant les éthers et on ajoute un cristal de chlorhydrate d'éthylglycocolle, on laisse pendant 24 heures à 0°. On recueille les cristaux déposés, on les essore et on les lave à l'alcool absolu à 0°.

Le produit de la dernière distillation, séparé de la majeure partie du glycocolle, est distillé dans le vide à une température maxima de 40°; au sirop épais, on ajoute directement dans le ballon la moitié de son volume d'eau puis son volume et demi d'éther, et on refroidit à — 5° dans un mélange de glace et de sel, on sature presque complètement HCl avec une lessive de soude très concentrée, versée par petites fractions et refroidie elle-même. A chaque addition on agite, la température, prise souvent, ne doit pas dépasser — 3°. Cette opération a pour but de faire passer dans l'oxyde d'éthyle les éthers faiblement basiques des *acides glutamique et aspartique*; on décante, on remplace l'oxyde d'éthyle par une nouvelle quantité et on ajoute de la soude jusqu'à alcalinisation, mais toujours en refroidissant: ce qu'il faut obtenir, c'est la décomposition des chlorhydrates d'éthers, mais non pas la saponification, il faut avoir la réaction suivante :



et non celle-ci :



ce qui ferait perdre le bénéfice des opérations précédentes, seuls les éthers des acides aminés étant solubles dans l'oxyde d'éthyle (Hugounenq) (38).

Quand l'alcalinisation faible est achevée, on ajoute à la masse liquide du carbonate de potasse sec et on épuise par agitation avec de l'éther anhydre. L'éther étant décanté, on ajoute encore du carbonate de potasse sec afin d'avoir une bouillie pateuse que l'on épuise avec de l'éther anhydre.

Finalement, cet éther étant chassé, on distille sous pression très réduite (1 mm.), et on fait une série de distillations fractionnées, on obtient ainsi du glycocolle, de l'alanine, de la leucine, de la valine, de la sérine, de la proline, de la phénylalanine, de l'acide aspartique, de l'acide glutamique, à l'état d'éthers que l'on saponifie et que l'on purifie.

Cette technique que nous donnons dans ses grands traits est excessivement longue et pénible, elle exige trop d'opérations et repose sur des séparations qui ne sont jamais absolues, il faut donc ne pas la considérer comme quantitative; du reste, aucun auteur ne l'a jamais proposée comme telle. Néanmoins, elle a une grande valeur, car elle a déjà permis de rattacher à des différences de constitution chimique, des différences de propriétés physiques et biologiques constatées depuis longtemps entre les diverses albumines.

Si, au lieu d'employer l'hydrolyse acide, on emploie l'hydrolyse barytique, on arrive presque aux mêmes résultats, comme l'ont montré MM. HUGOUNENQ et MOREL, mais l'arginine se trouve décomposée sous forme d'acide diaminovalérique et d'urée.

## § II. — Purifications des produits obtenus.

*Histidine.* — L'histidine se purifie par la méthode de KOSSEL et PATTEN (53) au moyen du sulfate mercurique qui précipite l'histidine. Après décomposition par  $H^2S$ , reprise par  $HCl$ , on obtient du chlorhydrate d'histidine pur.

*Arginine.* — L'arginine s'obtient soit à l'état libre, soit à l'état de chlorhydrate d'arginine. Pour l'avoir pur on passe par l'azotate double d'arginine et de cuivre; à une solution d'azotate d'arginine obtenue en saturant une solution d'arginine par l'acide azotique, on ajoute de l'hydrate d'oxyde de cuivre fraîchement préparé, on fait bouillir pendant quelques minutes, on filtre et on laisse évaporer sous la cloche à  $SO^4H^2$ . On obtient ainsi des houppes cristallines bleu foncé répondant à la formule



on les recueille. On peut les conserver à cet état ou les décomposer par l'hydrogène sulfuré, faire bouillir après filtration, précipiter par l'acide phosphotungstique et régénérer l'arginine libre ou en faire le chlorhydrate.

*Lysine.* — Par la transformation du picrate de lysine (p. 38) en chlorhydrate, on obtient du chlorhydrate de lysine pur.

*Glycocolle.* — Le glycocolle s'obtient à l'état de chlorhydrate d'éthylglycocolle mélangé à du chlorhydrate d'éthylalanine. On les recueille et pour les séparer on se base sur le peu de solubilité du chlorhydrate d'éthylglycocolle dans l'alcool absolu, on filtre, la liqueur filtrée contient le chlorhydrate d'éthylalanine mêlé à du chlorhydrate d'éthylglycocolle, on concentre, on reprend par l'alcool absolu et on recommence ainsi plusieurs fois cette opération.

Le chlorhydrate d'éthylglycocolle est agité avec de l'eau tenant en suspension de l'oxyde d'argent ou de l'oxyde de plomb fraîchement précipités, il se forme du chlorure d'argent ou du chlorure de plomb, on sépare, on fait passer  $H^2S$  dans la liqueur, filtre, porte à l'ébullition. L'éther est alors saponifié soit par la baryte, soit par l'eau, on recueille le glycocolle à l'état libre ou de glycollate de baryum que l'on peut facilement décomposer par la quantité théorique d'acide sulfurique.

*Alanine.* — L'alanine peut être obtenue soit à l'état de chlorhydrate d'éthylalanine ou d'alanine mélangée à de la leucine, de la valine, de la proline. Nous avons vu plus haut la séparation d'avec l'éthylglycocolle, il ne reste plus qu'à saponifier l'éthylalanine. Pour séparer l'alanine des autres amines, il faut faire une série de cristallisations fractionnées, l'alanine cristalline après la proline et la leucine : cette séparation est longue et difficile. On peut faire l'alaninate de baryte peu soluble, l'identifier, le purifier et le décomposer.

*Valine.* — La séparation de l'acide aminovalérique ou valine est difficile.

Il n'y a guère que la cristallisation fractionnée des acides aminés libres, alanine, valine et leucine ou de leurs sels de cuivre,

mais même à cet état la séparation est difficile et pénible, car il se forme des cristaux mixtes (FISCHER) (20).

On peut encore transformer les acides aminés en phénylhydantoïnes et les séparer par cristallisations fractionnées.

*Leucine.* — Nous venons de voir la séparation de ce corps d'avec la valine, l'alanine.

Quelquefois on retire une grande partie de la leucine avec la tyrosine avant l'éthérification, quand on concentre la liqueur débarrassée d'acide phosphotungstique. La tyrosine cristallise la première, mais quand la leucine se met à cristalliser, elle entraîne de petites portions de tyrosine et donne presque toujours la réaction de Millon.

Le magma noirâtre est dissous dans l'eau alcaline, chauffé à 80°, filtré, acidifié par l'acide acétique, la tyrosine, s'il y en a encore suffisamment, cristallise. Les eaux mères concentrées donnent de la leucine impure. On la redissout dans l'eau, décolore par le noir animal et on la fait cristalliser.

On met en suspension la leucine, contenant encore un peu de tyrosine, dans l'alcool absolu, on ajoute 30 % d'acide acétique cristallisable, la tyrosine reste insoluble. On la sépare. Les alcools mères évaporés, on chasse l'acide acétique; on reprend par l'eau, on fait cristalliser. On recommence cette opération plusieurs fois, on a ainsi de la leucine pure, brillante et ne donnant pas ou très faiblement la réaction de Millon.

Pour la purifier totalement on peut en faire le chlorhydrate de l'éthylleucine.

*Proline.* — On sépare la proline ou acide pyrrolidinecarbonique par l'alcool absolu bouillant et *absolument neutre*, elle est soluble dans ce solvant. On évapore à sec, on reprend par l'alcool absolu plusieurs fois, finalement on en fait le sel de cuivre que l'on décompose ensuite par H<sup>2</sup>S.

Le sel de cuivre de la proline active est soluble dans l'alcool, le sel de cuivre de la proline racémique est insoluble (FISCHER).

Pour l'obtenir cristallisée, on la dissout dans l'alcool ou la pyridine.

*Phénylalanine.* — La séparation à l'état d'éther est facile. En chauffant avec HCl fumant on saponifie et on transforme la phénylalanine à l'état de chlorhydrate, en reprenant par l'ammoniaque il se forme du chlorhydrate d'ammoniaque et l'acide est mis en liberté, on reprend par très peu d'eau qui laisse la phénylalanine.

Pour la purifier, on la précipite à l'état de phosphotungstate que l'on décompose: la phénylalanine donnant un précipité avec l'acide phosphotungstique mais seulement en solution concentrée.

*Acide glutamique.* — L'acide glutamique se trouve mélangé à du chlorure de sodium et à l'acide aspartique. S'il est à l'état d'éther on le saponifie par la baryte qui retient une grande partie de l'acide aspartique à l'état d'aspartate de baryte, on élimine la baryte par  $\text{SO}_4\text{H}^2$ , on concentre le sirop, on le traite par l'alcool absolu et l'acide chlorhydrique gazeux sec, ou refroidit. Le chlorhydrate de l'acide glutamique cristallise.

Pour avoir ce corps libre, on le dissout dans un peu d'eau et on ajoute la quantité théorique de soude titrée, l'acide glutamique mis en liberté et étant peu soluble dans l'eau se précipite cristallin. On le sépare du chlorure de sodium par cristallisation fractionnée.

*Acide aspartique.* — La purification de l'acide aspartique est basée sur le peu de solubilité de son sel de baryum. S'il est mélangé de sérine, il faut le traiter par l'éther de pétrole qui dissout la sérine et laisse les autres acides aminés.

*Tyrosine.* — Nous avons déjà parlé de la purification de la tyrosine à propos de son extraction (p. 38) et à propos de la leucine (p. 43).

---

## CHAPITRE II

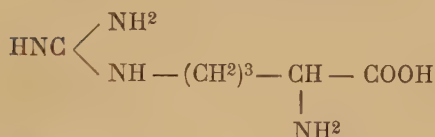
---

### PROPRIÉTÉS DE QUELQUES ACIDES AMINÉS <sup>(1)</sup>

#### § 1. Arginine.



guanidine de l'acide  $\alpha$   $\delta$  diaminovalérique



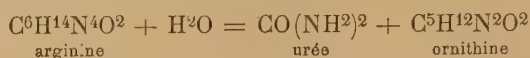
Dans l'hydrolyse de la caséine, DRECHSEL avait signalé à côté de la lysine, une deuxième base qu'il appela *lysatine*; plus tard HÉDIN (35) découvrit, dans la corne, la substance que SCHULZE et STIEGER avaient découverte dans le lupin et qu'ils avaient appelée *arginine*, il montra que la lysatine n'était qu'un mélange d'arginine et de lysine; les recherches de SCHULZE, KOSSEL et ses élèves, ont montré que cet acide diaminé est un produit constant de l'hydrolyse acide des albumines. Aucune n'a jusqu'ici été rencontrée ne renfermant pas d'arginine.

SCHULZE et WINTERSTEIN en ont fait la synthèse (75); ils établirent sa constitution, après avoir remarqué que l'arginine,

---

(1) Nous ne donnerons que les principales propriétés de ceux que nous avons particulièrement étudiés et trouvés dans nos recherches; nous n'en dirons d'ailleurs que quelques mots, renvoyant aux traités spéciaux.

sous l'action des alcalis, se dédoublait, en donnant de l'urée et de l'acide diaminovalérique ou ornithine



c'est donc la *guanidine de l'acide diaminovalérique*

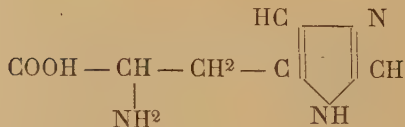


Ils vérifièrent ce résultat en faisant évaporer une solution d'ornithine, additionnée de quelques gouttes d'eau de baryte avec de la cyanamide.

L'arginine est une base fortement alcaline, cristallisant en géodes groupées en rosettes; elle est hygroscopique et absorbe l'acide carbonique de l'air. Elle a été bien étudiée par GULEWISTCH (32); elle se décompose à 207°, est très soluble dans l'eau, presque insoluble dans l'alcool. Elle donne des sels, les plus connus sont l'azotate, le chlorhydrate, le picrate; on obtient aussi des sels doubles de cuivre et d'arginine, d'argent et d'arginine, etc.

L'arginine est aussi intéressante au point de vue physiologique. Sous l'action d'un ferment existant dans l'intestin et le foie, l'*arginase*, isolé par KOSSEL et DAKIN, l'arginine est dédoublée (51) : ce qui fait supposer à ces auteurs qu'elle a un rôle actif dans la formation de l'urée.

## § 2. Histidine.



L'*histidine* a été découverte par KOSSEL parmi les produits d'hydrolyse de la sturine du sperme d'esturgeon (49), et a été trouvée par HÉDIN dans la caséine (34), par KOSSEL et ses élèves, SCHULZE et par bien d'autres chimistes comme produit fréquent de l'hydrolyse des albumines. Elle est surtout abondante dans la globine ou albumine de l'hémoglobine.

Les recherches sur la constitution de l'*histidine* ont été effectuées par HERZOG (36) et FRÆNKEL (26) et plus récemment par WEIGERT (82), PAULY (70), KNOOP et WINDHANS (48), FRÆNKEL (27); d'après les travaux les plus récents de KNOOP et WINDHAUS (83), l'*histidine* serait un dérivé de l'imidazol, tandis que FRÆNKEL en fait un dérivé pyrimidique.

L'*histidine* se présente sous la forme d'aiguilles et de tables, de réaction alcaline; elle est soluble dans l'eau, peu dans l'alcool, insoluble dans l'éther.

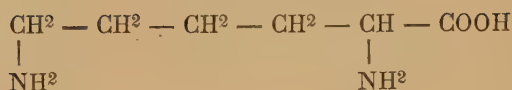
Le chlorhydrate d'*histidine*  $C^6H^9N^3O^2HCl + H^2O$  se présente sous la forme de tables rhombiques, assez facilement solubles dans l'eau, insolubles dans l'alcool et l'éther; lorsqu'on le dissout dans un peu d'HCl chaud et concentré et qu'on le précipite par de l'alcool éthéré, qu'on recommence plusieurs fois ce traitement, on obtient un bichlorhydrate  $C^6H^9N^3O^2.2 HCl$  cristallisant en grandes tables fusibles à 231-233°.

Les solutions d'*histidine* et de ses sels précipitent, par l'acide phosphotungstique et ne sont pas précipitées par le sous-acétate de plomb et le tannin.

### § 3. Lysine.



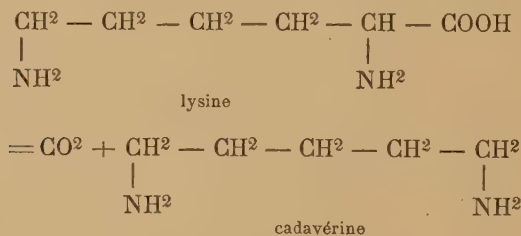
acide  $\alpha$   $\epsilon$  diaminocaproïque



a été découverte par DRECHSEL dans les produits de l'hydrolyse de la caséine (13), depuis on l'a trouvée dans un grand nombre de matières albuminoïdes. Dans tous les cas, c'est de la *lysine active* que l'on obtient.

Elle a été préparée synthétiquement par FISCHER et WEIGERT, mais inactive, en partant de l'*acide cyanopropylmalonique* (24).

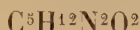
La synthèse a vérifié la conception de DRECHSEL qui voyait dans la lysine l'acide diaminocaproïque; d'ailleurs ELLINGER, abandonnant, à la putréfaction à 30° pendant 3 ou 4 jours, une solution de chlorhydrate de lysine à 1 % additionnée de fragments de pancréas putréfié, a pu isoler sous la forme de dérivé benzoylé, de la cadavérine ou pentaméthylènediamine (65)



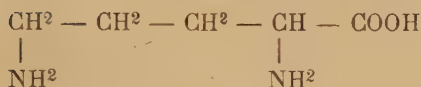
La lysine ne cristallise pas et se décompose assez facilement, le dichlorhydrate  $\text{C}^6\text{H}^{14}\text{N}^2\text{O}^2.2\text{HCl}$  fond à 192-193°. Le picrate, comme nous l'avons vu, est peu soluble dans l'eau.

Le chlorure de benzoyle agissant en milieu alcalin donne de la dibenzoyllysine ou acide lysurique fondant à 144-145°. Les sels de lysine sont précipités par l'acide phosphotungstique, mais ne le sont pas par l'azotate mercurique, l'azotate d'argent et la baryte, le sous-acétate de plomb, le tannin.

#### § 4. Ornithine.



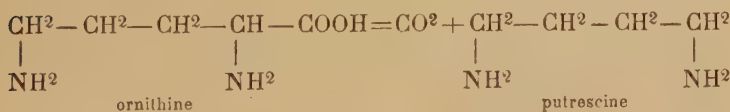
acide  $\alpha$   $\delta$  diaminovalérique



L'*ornithine* se trouve dans les produits de l'hydrolyse de l'ovalbumine par la baryte. Elle a été mise en évidence par SCHULZE et WINTERSTEIN en chauffant de l'arginine avec de l'eau de baryte (76), précédemment JAFFÉ l'avait trouvée à l'état d'acide ornithurique ou dibenzoylornithine dans l'urine de poules après ingestion d'acide benzoïque (46).

Elle a été préparée synthétiquement par Fischer à partir de l'acide  $\gamma$  phtalimidopropylmalonique.

Sa composition est établie par sa synthèse et par les expériences d'ELLINGER qui, en abandonnant à la putréfaction des solutions d'ornithine avec des fragments de pancréas, put isoler de la putrescine ou tétraméthylénediamine (15)



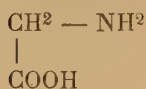
L'ornithine ne cristallise pas, sa solution aqueuse est très alcaline, elle dissout l'hydrate cuivrique, l'oxyde de mercure; elle précipite par l'acide phosphotungstique, le bichlorure de mercure; elle n'est pas précipitée par l'iodure double de mercure et de potassium, le nitrate d'argent et la baryte.

En résumé l'ornithine a des propriétés extrêmement voisines de la lysine dont elle ne diffère que par  $\text{CH}^2$ ; la séparation ne peut pas en être faite d'une façon absolue, et repose sur la différence de solubilité des picrates ou sur la transformation à l'état d'acide ornithurique et d'acide lysurique.

#### § 5. **Glycocolle.**



acide aminoacétique



Le *glycocolle* ou glycine, sucre de gélatine, acide glycolamidique, a été découvert par BRACONNOT (11) en faisant agir l'acide sulfurique sur la gélatine; beaucoup de matières animales en contiennent : MULDER l'a trouvé dans la viande (62), STRECKER dans la bile (79), NENCKI l'a rencontré parmi les produits de la putréfaction de la gélatine (64) et WÆCHLI dans ceux de l'élastine sous l'influence du pancréas de bœuf (81); il a été trouvé en petite quantité dans le tissu musculaire du *Pecten irradians*.

Il est contenu en assez grande proportion dans la canne à sucre, les graminées. Il existe dans l'économie où jusqu'à présent on n'a pas pu l'isoler à l'état libre, mais il joue cependant un rôle incontestable; la bile le renferme à l'état de glycocholate de soude à des doses fort variables.

Au point de vue de son origine dans l'organisme, il faut le considérer comme un produit de désassimilation régressive des matières albuminoïdes.

Synthétiquement on prépare le glycocolle par une série de procédé : le plus employé est celui de KRAUT en faisant agir un grand excès d'ammoniaque sur l'acide monochloracétique (54).

Certains sels et éthers du glycocolle sont intéressants au point de vue biologique, tels sont la sarcosine ou méthylglycocolle, l'acide hippurique ou benzoylglycocolle...

Le glycocolle est un corps blanc, cristallisé, soluble dans l'eau, peu soluble dans l'alcool, de saveur sucrée, fusible vers 232° en se décomposant. Il réduit l'azotate mercurieux et se colore en rouge par le perchlorure de fer neutre (ENGEL)<sup>(17)</sup>; étant basique et acide, il donne des glycollates de magnésium, de calcium, etc..., ainsi que des chlorhydrate, nitrate... de glycocolle.

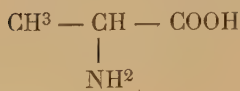
Injecté dans la circulation, la plus grande partie se transforme en urée. KUTSCHER et SCHENCK ont montré (55) que par oxydation des matières albuminoïdes au moyen du permanganate de calcium, on obtenait des quantités d'acide oxalique d'autant plus considérables que le protéique attaqué était plus riche en glycocolle. LOMMEL a constaté aussi que l'ingestion de gélatine, dont

on connaît la richesse en glycocolle, faisait monter l'excrétion de l'acide oxalique. Ces faits jetteraient un jour nouveau sur la question de l'oxalurie.

§ 6. **Alanine.**



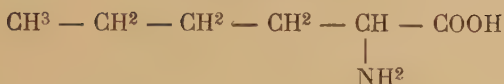
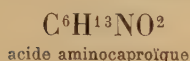
acide  $\alpha$  aminopropionique



Corps homologue supérieur du glycocolle, que l'on rencontre avec lui dans l'hydrolyse des matières albuminoïdes. Ingérée, elle produit chez le lapin, une augmentation considérable dans la proportion d'urée excrétée, mais SALKOWSKI a remarqué qu'une partie de l'alanine était éliminée en nature (73). D'après GAGLIO, l'alanine exercerait une action déprimante sur le cerveau et la moelle allongée de la grenouille. Chez les pigeons la dose toxique serait de 1 gr. On constate une paralysie spinale et la mort survient avec un abaissement considérable de la température.

L'alanine est un corps solide, cristallisant en prismes obliques à base rhombe, assez soluble dans l'eau froide, elle est plus soluble dans l'eau chaude, insoluble dans l'éther, peu soluble dans l'alcool (1/500), sous l'influence d'une température voisine de 200° elle se sublime en petits cristaux neigeux.

§ 7. — **Leucine.**



La *leucine* est très répandue chez les êtres vivants; à l'état physiologique, on l'a trouvée dans la rate, le pancréas, les ganglions lymphatiques, les glandes salivaires, et à l'état pathologique dans le foie des leucocythémiques, des varioleux, des typhiques.

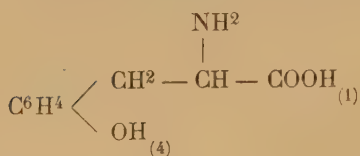
Ce corps a été découvert par PROUST dont les produits de putréfaction du gluten et du fromage en présence de l'eau (71), BRACONNOT l'a obtenu comme produit de décomposition de quelques matières albuminoïdes. On le rencontre chez un grand nombre d'animaux et de plantes, partout où des matières albuminoïdes sont en voie de dédoublement par l'action des réactifs, par la putréfaction, ou au cours de la vie cellulaire normale (HUGOUNENQ).

C'est un corps blanc, se présentant sous forme de lamelles, peu solubles dans l'eau, presque insolubles dans l'alcool, fusibles vers 170° en se décomposant: en solution chlorhydrique la leucine est levogyre. Chauffée avec de la chaux, elle dégage de l'amylamine. On connaît un grand nombre d'isomères de la leucine bien étudiés par FISCHER et ses élèves.

§ 8. — **Tyrosine.**



acide paraoxyphénylaminopropionique

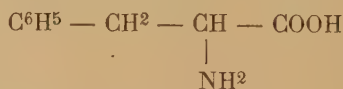


La *tyrosine* accompagne constamment la leucine parmi les produits de dédoublement des matières protéiques, elle a été découverte en 1846, par LIEBIG, en fondant la caséine avec de la potasse (60), puis on la trouva dans l'hydrolyse acide d'une série d'albumines ; elle se rencontre dans la rate, le pancréas, le foie, dans le sang des veines hépatiques, l'urine.

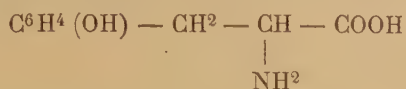
C'est un corps blanc en aiguilles soyeuses, solubles dans l'eau bouillante, peu solubles dans l'eau froide, (1/1900), se combinant avec les acides, mais plus facilement avec les bases, à cause de ses fonctions phénolique et acide.

La tyrosine donne la réaction de Millon. Traitant par l'acide sulfurique concentré additionné d'un peu d'acide fumant, saturant à l'ébullition par le carbonate de baryte, on obtient une coloration violette par le perchlorure de fer, comme d'ailleurs avec beaucoup de phénols (PIRIA).

On peut considérer la tyrosine comme dérivant de la phénylalanine



Celle-ci par l'action d'un mélange d'acides sulfurique et nitrique fournit entre autres produits de la paranitrophénylalanine que l'on peut transformer en chlorhydrate de paramidophénylalanine, point de départ de la synthèse de la tyrosine



La tyrosine, comme la leucine, est peu soluble dans l'eau, mais cette solubilité est beaucoup plus grande par suite de la présence d'impuretés ou de sels minéraux.

---

## CHAPITRE III

---

### COMPOSITION DE NOS MILIEUX DE CULTURE RÉSULTATS OBTENUS

M. LEPIERRE ayant montré que les microbes pouvaient être cultivés dans des milieux à base de *glucoprotéines*  $\alpha$ , et celles-ci, comme nous l'avons vu, étant constituées par des *mélanges d'acides aminés et de polypeptides*, nous avons pensé à rechercher si ces mêmes microbes pouvaient être cultivés en milieux où n'entreraient que ces acides aminés, ou des polypeptides, ou des mélanges de ces deux sortes de corps.

Les faits qui vont suivre ne sont que des résultats préliminaires, et ce ne sera qu'ultérieurement que nous donnerons des résultats plus précis; actuellement, nous sommes loin d'être arrivés au point où nous voulions, il faut encore des années pour mener à bien ce travail. L'extraction des acides monoaminés et diaminés, à partir d'une albumine, est longue et difficile; de plus, aucune méthode sûre n'existe pour l'extraction des multiples produits fabriqués par un microbe, aux dépens des corps azotés et hydrocarbonés. Quoi qu'il en soit, je donnerai les résultats obtenus jusqu'à ce jour par LACOMME, MOREL et GALIMARD, nous réservant la continuation de ces travaux.

Notre ami et collègue, le D<sup>r</sup> L. LACOMME, préparateur d'hygiène à la Faculté de Médecine de Lyon, a bien voulu nous aider de sa collaboration pour la partie bactériologique de ce travail (ensemencements et examens microscopiques.)

Nous avons employé plusieurs sortes de liquides nutritifs, les uns ne renfermant que des acides aminés comme matière organique, les autres renfermant en plus de la glycérine. Comme il fallait s'y attendre, les milieux où n'entre pas de glycérine sont moins nutritifs que les autres.

Primitivement, nous avons employé le sucre, mais quelques essais faits avec cet hydrocarbure et la leucine, comme corps azoté, ont été abandonnés; la stérilisation n'a pu être complète à 100° même en la répétant trois jours de suite; à une température plus élevée, il y avait commencement de caramélisation.

Pour les sels minéraux, nous avons surtout employé la *constante minérale* de M. LEPIERRE, mais dans quelques essais nous avons employé le milieu d'ARNAUD et CHARRIN, en remplaçant l'asparagine par l'acide aminé, à étudier. Ce dernier milieu, moins chargé en sels minéraux, était plus facile à manipuler après la culture, mais était de beaucoup moins nutritif que le milieu de Lepierre.

Nous avons donné p. 13 la composition des milieux de LEPIERRE et, p. 9, celle du milieu d'ARNAUD et CHARRIN; nous n'y reviendrons pas. Nous faisons remarquer que l'addition de glycérophosphate de chaux aux milieux, comme le fait LEPIERRE, a l'avantage de ne pas précipiter les bicarbonates alcalins, tout au moins dans les proportions données, et que, de plus, il fournit aux

microbes du phosphore, sous une forme particulièrement assimilable.

Pour faire nosensemencements, nous sommes partis de *cultures sur milieux solides*, considérant que cette méthode était à l'abri de toute critique. En effet, si nous étions parti de cultures en milieux liquides, comme les bouillons ordinaires, on aurait pu nous objecter qu'en même temps que nous déposions le microbe dans notre milieu nous introduisions dans ce dernier des albumines, contenues dans le bouillon de culture ; on pouvait toujours prétendre que la végétation du microbe s'était produite aux dépens de ces albuminoïdes. En partant de milieux solides, nous écartions cette critique, qui a été formulée vis-à-vis des expériences d'OUCHINSKY.

Nos recherches ont porté sur l'urée, le glycocolle, la leucine, la tyrosine, l'arginine, la lysine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la phénylalanine.

Les bouillons stérilisés à 120° pendant 45 minutes sontensemencés avec les précautions nécessaires et portés à l'étuve à 37° où ils ont été laissés pendant un temps plus ou moins long.

Voici les premiers résultats que j'ai obtenus avec MM. A. MOREL et L. LACOMME dans des milieux ainsi composés :

|                               |                            |
|-------------------------------|----------------------------|
| Acide aminé . . . . .         | 1 gr.                      |
| Chlorure de sodium . . . . .  | 0,5                        |
| Sulfate de magnésie . . . . . | 0,05                       |
| Bicarbonate de potasse . . .  | q. s. pour alcaliniser (1) |

---

(1) Le bicarbonate de potasse employé à la dose indiquée par LÉPIERRE ne suffisant pas toujours à alcaliniser, nous avons préféré mettre q. s. que de nous limiter à 0,3 %.

|                           |                     |
|---------------------------|---------------------|
| Glycérophosphate de chaux | 0,2                 |
| Glycérine (1).....        | 1,5                 |
| Eau .....                 | q. s. pour 100 cmc. |

#### GLYCOCOLLE

Dans le glyocolle synthétique  $C^2H^5NO^2$ , nous avons cultivé *B. pyocyannique*, *M. prodigiosus*, *Colibacille R<sup>2</sup>*, *Pneumobacille de Friedlander*, *B. de la diarrhée verte* (2).

#### LEUCINE

Dans la leucine provenant de l'hydrolyse acide ou barytique de l'ovalbumine (J. Galimard et A. Morel), (3) nous avons cultivé : *B. pyocyannique*, *B. de la diarrhée verte*, *Colibacille R<sup>2</sup>*, *M. prodigiosus*, *Pneumobacille de Friedlander*.

#### TYROSINE

Dans la tyrosine provenant de l'hydrolyse de l'ovalbumine (J. Galimard) : *B. pyocyannique*, *B. de la diarrhée verte*, *Colibacille R<sup>2</sup>*.

#### ACIDE ASPARTIQUE

Dans un milieu contenant 1 % d'acide aspartique provenant de l'hydrolyse de l'ovalbumine (A. Morel) : *bacille pyocyannique*.

---

(1) La quantité de glycérine employée dans nos milieux est légèrement plus faible que dans les milieux de LÉPIERRE : 1,5 au lieu de 2 à 3 %.

(2) Nous nous sommes toujours assurés que les cultures étaient bien positives, réensemencant nos premières cultures, car on aurait pu jusqu'à un certain point, nous objecter que le trouble obtenu en première génération était dû aux grumeaux ayant servi à l'ensemencement et qui se seraient dissociés, de plus, l'examen microscopique a toujours été fait pour nous assurer que nous n'avions pas de contamination.

(3) Les noms entre parenthèses, suivant les noms des produits, indiquent leur provenance.

LYSINE

Dans le chlorhydrate de lysine  $C^6H^{14}N^2O^2HCl$  provenant de l'hydrolyse acide de la vitelline (L. Hugounenq et A. Morel) : *B. pyocyannique*.

ARGININE

Dans le chlorhydrate d'arginine  $C^6H^{14}N^4O^2HCl$  provenant de l'hydrolyse acide de la vitelline (L. Hugounenq et A. Morel) : *B. pyocyannique*, *Colibacille R<sup>2</sup>*, *B. de la diarrhée verte*.

URÉE

Dans l'urée (1) : *B. pyocyannique*, *B. de la diarrhée verte*.

Nous pouvons résumer ces résultats dans le tableau suivant :

TABEAU N° 1

Acides aminés purs.

| MICROBES (1)                                  | GLYCOCOLLE | LEUCINE | TYROSINE | ACIDE<br>ASPARTIQUE | LYSINE | ARGININE | URÉE | PHÉNYL-<br>ALANINE |
|-----------------------------------------------|------------|---------|----------|---------------------|--------|----------|------|--------------------|
| <i>B. pyocyannique</i> . . . . .              | +          | +       | +        | +                   | +      | +        | +    | —                  |
| <i>Colibacille R<sup>2</sup></i> . . . . .    | +          | +       | +        | —                   |        | +        |      | —                  |
| <i>Sarcina superba</i> . . . . .              | —          | —       | —        | —                   |        |          |      | —                  |
| — <i>érythromyxa</i> . . . . .                | —          | —       | —        | —                   |        |          |      | —                  |
| — <i>rosea</i> . . . . .                      | —          | —       | —        | —                   |        |          |      | —                  |
| <i>M. prodigiosus</i> . . . . .               | +          | +       | —        | —                   |        |          |      | —                  |
| <i>Pneumobacille de Friedlander</i> . . . . . | +          | +       | —        | —                   |        |          |      | —                  |
| <i>Staphylocoque orangé</i> . . . . .         | —          | —       | —        | —                   |        |          |      | —                  |
| <i>B. de la diarrhée verte</i> . . . . .      | +          | +       | +        | —                   |        | +        | —    | —                  |
| Tétanos . . . . .                             | —          | —       | —        | —                   | —      | —        |      | —                  |
| Charbon . . . . .                             | —          | —       | —        | —                   |        |          |      | —                  |
| Diphthérie . . . . .                          | —          | —       | —        | —                   | —      | —        |      | —                  |
| Tuberculose . . . . .                         | —          | —       | —        | —                   | —      |          |      | —                  |
| Tétragène . . . . .                           | —          | —       | —        | —                   |        |          |      | —                  |

+ signifie culture positive.

— » » négative.

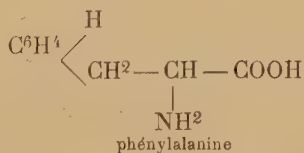
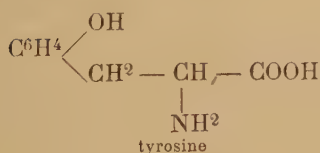
(1) Nous avons aussi essayé l'urée quoiqu'elle ne rentre pas dans les acides aminés ; mais c'est un produit ultime du dédoublement des albuminoïdes et c'est à ce titre que nous l'avons utilisée.

Sauf pour la tyrosine, tous nos milieux de culture contenaient 1 % de ces acides aminés; ceux à base de tyrosine étaient des milieux saturés de ce composé.

Le *bacille pyocyannique* a donné des cultures positives avec tous les acides aminés donnés (sauf avec la phénylalanine) et nous avons obtenus une série de générations en glycocolle, tyrosine, arginine, urée, etc. Nous avons de plus essayé de cultiver ce bacille dans le milieu d'Arnaud et Charrin en remplaçant l'asparagine par de l'urée, dans ce milieu dépourvu de glycérine le *bacille pyocyannique* n'a pas végété.

Le *bacille de la diarrhée verte* a donné des cultures positives avec le glycocolle, la leucine, la tyrosine, l'arginine, il en est de même du *colibacille R*<sup>2</sup>.

D'après LEPIERRE, la tyrosine renfermant un noyau benzénique ne pouvait fournir de l'azote aux microbes, or comme nous venons de le voir, plusieurs ont donné des cultures positives en ce milieu; il est vrai qu'avec la phénylalanine, provenant de l'hydrolyse barytique de l'ovalbumine (A. Morel), nous n'avons eu *jusqu'ici* que des cultures négatives. Pouvons-nous, *dès à présent*, faire un rapprochement quelconque entre la phénylalanine et la tyrosine au point de vue de leur constitution et de leur valeur nutritive, nous ne le pensons pas, n'ayant pas assez d'expériences à ce sujet. La tyrosine ne diffère de la phénylalanine que par un OH phénolique qui pourrait peut être avoir une action nutritive quelconque



Nous avons aussi essayé des mélanges d'acides aminés qui nous ont donné les résultats suivants :

#### EXPÉRIENCE I

|                       |                                |                         |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------|
|                       | Leucine (1).....               | 7 gr. 5                 |
|                       | Alanine (1).....               | 2.5                     |
|                       | Tyrosine (1).....              | traces.                 |
| Constante<br>minérale | Chlorure de sodium.....        | 5 gr.                   |
|                       | Sulfate de magnésie.....       | 0.5                     |
|                       | Bicarbonate de potasse....     | q. s. pour alcaliniser. |
|                       | Glycérophosphate de chaux..... | 2 gr.                   |
|                       | Glycérine.....                 | 15 gr.                  |
|                       | Eau.....                       | q. s. pour 1000 cc.     |

Ce milieu réparti en petits ballons de 30 à 35 cc. et stérilisé a donné des cultures positives avec *B. pyocyannique*, *M. prodigiosus*, *Colibacille R<sup>2</sup>*, *Pneumobacille de Friedlander*, *Tétragène*, *Staphylocoque orangé*, *Sarcina superba*.

#### EXPÉRIENCE II

|                                              |                     |
|----------------------------------------------|---------------------|
| Mélange contenant des acides monoaminés avec |                     |
| de la lysine et de l'ornithine (2).....      | 15 gr.              |
| Constante minérale de l'expérience I.        |                     |
| Glycérine.....                               | 15 gr.              |
| Eau.....                                     | q. s. pour 1000 cc. |

Cultures positives avec *B. pyocyannique*, *Sarcina superba*, *Sarcina erythromyxa*, *Sarcina rosea*, *Pneumobacille de Friedlander*, *Staphylocoque orangé*, *Tétragène*.

(1) La leucine, l'alanine, la tyrosine proviennent de l'hydrolyse barytique de l'ovalbumine (A. Morel).

(2) Ce mélange d'acides aminés provient de l'hydrolyse barytique de l'ovalbumine (A. Morel).

### EXPÉRIENCE III

|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| Glycocolle (1).....                   | 3 gr.               |
| Leucine (2).....                      | 0.5                 |
| Tyrosine (2).....                     | 0.1                 |
| Ac. aspartique (3).....               | 1 gr.               |
| Chlorhydrate d'arginine (4)...        | 2.30                |
| Constante minérale de l'expérience I. |                     |
| Glycérine.....                        | 15 gr.              |
| Eau.....                              | q. s. pour 1000 cc. |

Cultures positives avec *B. pyocyannique*, *Colibacille R<sup>2</sup>*, *Paratyphique*, *Psittacose*, *B. citreus*, *B. subtilis*, *Choléra*, *Pneumobacille de Friedlander*, *Dysenterie*, *Charbon*, *Coccus (Lille)*.

### EXPÉRIENCE IV

|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| Glycocolle (1).....                   | 4 gr. 50            |
| Leucine (5).....                      | 0.1                 |
| Tyrosine (2).....                     | 0.5                 |
| Chlorhydrate d'arginine (4)...        | 1.5                 |
| Constante minérale de l'expérience I. |                     |
| Glycérine.....                        | 15 gr.              |
| Eau.....                              | q. s. pour 1000 cc. |

Cultures positives avec *B. pyocyannique*, *Choléra*,

---

(1) Glycocolle synthétique.

(2) La leucine et la tyrosine proviennent de l'hydrolyse acide de la corne (J. Galimard et A. Cotton).

(3) L'acide aspartique provient de l'hydrolyse barytique de l'ovalbumine (A. Morel).

(4) Le chlorhydrate d'arginine provient de l'hydrolyse acide de l'ovalbumine (L. Hugounenq et J. Galimard).

(5) Leucine provenant de l'hydrolyse acide de la vitelline (L. Hugounenq).

*Pneumobarille de Friedlander, B. subtilis, Diarrhée verte, Paratyphique, Colibacille R<sup>2</sup>.*

EXPÉRIENCE V

|                                       |                    |
|---------------------------------------|--------------------|
| Glycocolle (1) .....                  | 7 gr.              |
| Arginine (2).....                     | 1 gr.              |
| Constante minérale de l'expérience I. |                    |
| Glycérine.....                        | 15 gr.             |
| Eau.....                              | q. s. pour 1000 cc |

Cultures positives avec *B. Pyocyanique, Colibacille R<sup>2</sup>, Paratyphique, Choléra, B. citreus, Diarrhée verte, B. subtilis, Psittacose, Pneumobacille de Frielander.*

EXPÉRIENCE VI

|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| Leucine (3).....                      | 4 gr. 5             |
| Tyrosine (4).....                     | 0.5                 |
| Chlorhydrate d'arginine (5)...        | 1 gr.               |
| Constante minérale de l'expérience I. |                     |
| Glycérine.....                        | 15 gr.              |
| Eau.....                              | q. s. pour 1000 cc. |

Cultures positives avec *B. pyocyanique, Colibacille R<sup>2</sup>, Choléra, Diarrhée verte, Coccus (Lille), Paratyphique, Pneumobacille de Friedlander, Bacillus citreus, Psittacose.*

---

(1) Glycocolle synthétique.

(2) Arginine provenant de l'hydrolyse acide de la corne (L. Hugounenq).

(3) Leucine provenant de l'hydrolyse barytique de l'ovalbumine (A. Morel et J. Galimard).

(4) Tyrosine provenant de l'hydrolyse acide de la corne (J. Galimard et A. Cotton).

(5) Chlorhydrate d'arginine provenant de l'hydrolyse acide de l'ovalbumine (L. Hugounenq et J. Galimard).

EXPÉRIENCE VII

|                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| Glycocolle (1).....                   | 2 gr.               |
| Chlorhydrate d'arginine (2)...        | 4 gr.               |
| Chlorhydrate de lysine (2)....        | 1 gr.               |
| Constante minérale de l'expérience I. |                     |
| Glycérine.....                        | 15 gr.              |
| Eau.....                              | q. s. pour 1000 cc. |

Cultures positives avec *B. pyocyannique*, *Diarrhée verte*, *B. citreus*, *B. subtilis*, *Charbon*, *Choléra*, *Paratyphique*, *Colibacille R<sup>2</sup>*.

Ces expériences peuvent être résumées dans le tableau n° 2. (Voir tableau ci-après.)

Comme on le voit, il est à remarquer, ce qui était d'ailleurs à prévoir, *a priori*, que dans des mélanges d'acides aminés, les résultats étaient meilleurs qu'avec des acides aminés pris seuls. Nous espérons arriver en étudiant ces mélanges de plus près à pouvoir cultiver les *microbes à toxines* tels que diphtérie, tétanos, etc.

Toutes ces cultures commencèrent à se troubler au bout d'un temps plus ou moins long. L'examen microscopique, fait au début, ne nous a montré aucun changement appréciable dans l'allure générale des bacilles. Sauf quelques retards, les cultures dans ces milieux chimiquement définis se sont comportées d'une façon à peu près identique à celle que l'on observe en bouillon ordinaire.

---

(1) Glycocolle synthétique.

(2) Les chlorhydrates d'arginine et de lysine proviennent de l'hydrolyse acide de l'ovalbumine. (L. Hugounenq et J. Galimard.)

TABLEAU N° 2  
*Mélanges d'acides aminés*

| ACIDES AMINÉS                     | I      | II    | III      | IV       | V       | VI      | VII      |
|-----------------------------------|--------|-------|----------|----------|---------|---------|----------|
|                                   | °/o    |       | °/o      | °/o      | °/o     | °/o     | °/o      |
| Mélange d'acides mono-aminés..... | »      | ..... | »        | »        | »       | »       | »        |
| Glycocolle.....                   | »      | »     | 43.47    | 68.20    | 87.5    | »       | 57.15    |
| Leucine.....                      | 75.0   | »     | 7.25     | 1.5      | »       | 75.0    | »        |
| Alanine.....                      | 25.0   | »     | »        | »        | »       | »       | »        |
| Tyrosine.....                     | traces | »     | 1.45     | 7.53     | »       | 8.3     | »        |
| Acide aspartique.....             | »      | »     | 14.50    | »        | »       | »       | »        |
| Arginine.....                     | »      | »     | 33.33(1) | 22.52(1) | 12.5(2) | 16.6(1) | 28.57(1) |
| Lysine.....                       | »      | ..... | »        | »        | »       | »       | 14.28(1) |
| Ornithine.....                    | »      | ..... | »        | »        | »       | »       | »        |
| <b>Microbes (3)</b>               |        |       |          |          |         |         |          |
| B. citreus.....                   |        |       | +        |          | +       | +       | +        |
| B. diarrhée verte....             | +      | —     | —        | +        | +       | +       | +        |
| B. Eberth.....                    |        | —     |          | —        | —       | —       |          |
| B. subtilis.....                  |        | —     | +        | +        | +       | —       | +        |
| B. pyocyanique.....               | +      | +     | +        | +        | +       | +       | +        |
| Charbon.....                      | —      | —     | +        | —        | —       | —       | +        |
| Choléra.....                      |        |       | +        | +        | +       | +       | +        |
| Coccus (Lille).....               |        |       | +        | —        | —       | +       |          |
| Colibacille R <sup>2</sup> .....  | +      | —     | +        | +        | +       | +       | +        |
| Diphtérie.....                    | —      | —     | —        | —        | —       | —       | —        |
| Dysenterie.....                   |        |       | +        | —        | —       | —       | —        |
| M. carneus.....                   |        |       | —        | —        | —       | —       | —        |
| M. cremoides.....                 |        |       | —        | —        | —       | —       | —        |
| M. prodigiosus.....               | +      | —     |          |          |         |         |          |
| Paratyphique.....                 |        |       | +        | +        | +       | +       | +        |
| Psittacose.....                   |        |       | +        | —        | +       | +       | —        |
| Pneumobacille de Friedlander..    | +      | +     | +        | +        | +       | +       | —        |
| S. erythromyxa.....               | —      | +     | —        | —        | —       | —       | —        |
| S. rosea.....                     | —      | +     | —        | —        | —       | —       | —        |
| S. superba... ..                  | +      | +     |          | —        | —       |         | —        |
| Staphylocoque orangé              | +      | +     | —        | —        |         |         | —        |
| Tétanos.....                      | —      | —     |          |          |         |         |          |
| Tétragène.....                    | +      | +     |          | —        | —       | —       | —        |
| Tuberculose.....                  | —      | —     | —        | —        | —       | —       | —        |

+ signifie culture positive.

— » » négative.

(1) Arginine (ou lysine) calculée à l'état de chlorhydrate et ayant été utilisée comme telle.

(2) Arginine calculée à l'état libre et ayant été utilisée comme telle.

(3) Dans ce tableau nous considérons comme négatives les cultures qui n'ont pas poussé après le 5<sup>e</sup> jour, nous réservant dans un mémoire ultérieur de compléter nos résultats.

## CHAPITRE IV

---

### NATURE CHIMIQUE DE QUELQUES PRODUITS FABRIQUÉS PAR LES MICROBES AUX DÉPENS DES ACIDES AMINÉS

Poursuivant plus loin l'étude des microbes en milieux chimiquement définis à base d'acides aminés, nous avons voulu étudier la composition des matériaux formés au dépens de la matière azotée. Mais cette étude est fort longue, car le poids des matières protéiques recueillies et purifiées atteint à peine quelques centigrammes par litre, les analyses et les propriétés de ces corps sont donc difficiles à étudier.

ARNAUD et CHARRIN (6) ont étudié les produits formés par le bacille pyocyanique en milieux où n'entrait que de l'asparagine comme corps azoté, ils ont montré que ce microbe consommait l'asparagine après l'avoir dédoublée en ammoniacque et acide aspartique qui ne tardait pas lui-même à subir une destruction profonde en ammoniacque et acide carbonique; ils virent que la formation de la pyocyanine atteignait de 0 gr. 003 à 0 gr.006 par litre, même dans des cultures assez colorées, et que l'on retrouvait une partie de l'azote dans le protoplasma du bacille et dans des

combinaisons organiques non déterminées. Ces auteurs constatèrent la formation de produits solubles autres que les pigments que l'on rencontre dans les cultures du bacille pyocyanique, ils divisèrent ces produits en trois groupes (7) :

1° Produits volatils, vaso-constricteurs, d'une action passagère sur les espèces animales ;

2° Produits précipitables par l'alcool, non dialysables, capables de déterminer de la fièvre, de la diarrhée, de l'albuminurie et des hémorragies, très toxiques pour les animaux qu'ils tuent ou cachectisent ; quelques produits du même groupe sont simplement vaccins ;

3° Produits solubles dans l'alcool, dialysables qui agissent comme convulsifs, toxiques mais non vaccins.

ARNAUD et CHARRIN n'étudièrent pas ces corps au point de vue de leur composition chimique.

ANTOINE (4) dans sa thèse sur la multiplicité des produits formés par un microbe pathogène, en l'espèce le bacille pyocyanique, dit n'avoir pas réussi à cultiver ce microbe dans des milieux renfermant par 100 cc. : *2 grammes d'urée et 1 gramme de peptone*. Or, dans des milieux que nous avons faits ayant la composition suivante :

|                               |                     |
|-------------------------------|---------------------|
| Urée.....                     | 10 gr.              |
| Chlorure de sodium.....       | 0,5                 |
| Sulfate de magnésie.....      | 5 gr.               |
| Glycérophosphate de chaux.... | 2 gr.               |
| Bicarbonate de potasse.....   | 1,5                 |
| Glycérine.....                | 15 gr.              |
| Eau distillée.....            | q. s. pour 1000 cc. |

le bacille pyocyanique pousse parfaitement en donnant le pigment fluorescent vert, mais très rarement de la pyocyanine. L'urée est complètement détruite au bout d'un temps plus ou moins long en ses éléments, acide carbonique et ammoniacque. De plus nous avons remarqué que la matière odorante signalée par BABÈS (8) dans les cultures du bacille pyocyanique ne se retrouvait que dans nos bouillons tyrosinés. Cette odeur particulière que l'on peut rapprocher de la coumarine dérive très probablement de la tyrosine et doit être formée aux dépens de cet acide aminé très voisin. Elle est assez difficile à isoler et souvent nous l'avons eue soit mélangée à la pyocyanine à laquelle elle lui communique son parfum, soit entraînée avec l'extrait éthéré des bouillons de culture.

La quantité de pyocyanine que l'on peut retirer des milieux tyrosinés (tyrosine à saturation) est légèrement supérieure à celle que donnent ARNAUD et CHARRIN; nous avons obtenu en moyenne 0 gr. 0075 de pyocyanine pure, cristallisée, par litre de bouillon ayant la formule suivante :

|                            |                         |
|----------------------------|-------------------------|
| Tyrosine à saturation..... | q. s.                   |
| Chlorure de sodium .....   | 5 gr.                   |
| Sulfate de magnésie.....   | 0,5                     |
| Glycérophosphate de chaux  | 2 gr.                   |
| Glycérine .....            | 15 gr.                  |
| Eau distillée.....         | q. s. pour 1000 cmc.    |
| Bicarbonate de potasse...  | q. s. pour alcaliniser. |

Nous l'avons extrait par les procédés connus : agitation avec  $\text{CHCl}_3$ , puis purification en passant par le

chlorhydrate de pyocyanine. Si l'on remplace la tyrosine par de la lysine, la quantité de pyocyanine formée est encore plus élevée.

En dehors de ce pigment bien connu nous avons recueilli et isolé de petites quantités d'albumine ou plutôt de matières protéiques, ayant une teneur en azote variant de 10 à 12 %, donnant les réactions de Millon et de biuret ne contenant pas de phosphore mais contenant du soufre. Par l'éther, nous avons enlevé une matière grasse difficilement saponifiable, contenant de l'acide glycérophosphorique et ayant les allures des lécithines. De plus les bouillons de culture tyrosinés contiennent même au bout de 235 jours de la tyrosine inattaquée, en très petite quantité il est vrai, et une forte proportion d'ammoniaque. Il semble que la molécule a été complètement détruite et jusqu'ici nous n'avons pu mettre en évidence le noyau benzénique.

N'ayant pas eu le temps voulu d'étudier la transformation de chaque acide aminé sous l'action des microbes, je me contenterai de donner ici les résultats obtenus pour le bacille de la diarrhée verte en milieu glycocollé. Ultérieurement je donnerai les résultats des recherches que je poursuis de concert avec M. LACOMME.

#### **Culture du bacille de la diarrhée verte en glycocolle**

Le milieu est ainsi constitué :

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| Glycocolle.....             | 8 gr. |
| Chlorure de sodium.....     | 4 gr. |
| Glycérophosphate de chaux.. | 1,8   |

|                                  |                             |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Sulfate de magnésie . . . . .    | 0,4                         |
| Glycérine . . . . .              | 10 gr.                      |
| Bicarbonate de potasse . . . . . | 3 gr.                       |
| Eau . . . . .                    | q. s. p. 800 <sup>cmc</sup> |

Ce bouillon a été stérilisé à 120° pendant 45 minutes puis ensemencé en partant d'un milieu solide. Le bacille de la diarrhée verte qui nous a servi, était conservé depuis plusieurs mois dans le laboratoire d'hygiène de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon. Les 800<sup>cmc</sup> de liquide contiennent 8 gr. de glycolle, soit 1 gr. 49 d'azote.

Au bout de 4 jours, à 37°, la culture commença à se troubler et peu à peu devint très abondante. L'examen microscopique fait au début ne nous a montré aucun changement dans l'allure générale du bacille de la diarrhée verte, et sauf le retard, la culture dans ce milieu chimiquement défini s'est comportée d'une façon à peu près identique à celle que l'on observe en bouillon ordinaire.

Au bout de 119 jours, l'étude des modifications chimiques a été entreprise ; à ce moment la culture était très virulente, la réaction alcaline. Avant l'ensemencement, la réaction de Millon était négative tandis qu'après la sortie de l'étuve elle était positive. Traces d'ammoniaque.

On filtre au papier Chardin pour séparer le dépôt constitué par des sels minéraux (en grande partie CaO) et des corps microbiens, soit **A** ce dépôt ; le liquide filtré, acidifié légèrement par  $\text{SO}^4\text{H}^2$ , est précipité par 2 fois son volume d'alcool à 93°, on laisse reposer 24 heures, on filtre et on recueille un précipité **B** ; les

eaux mères alcooliques sont débarrassées d'alcool par distillation et évaporées à 200 cmc., reprécipitées par 4 fois leur volume d'alcool à 93°, il se précipite des sels minéraux, on filtre; le liquide filtré est évaporé à 50 cmc., agité avec de l'éther. Celui-ci évaporé laisse un faible résidu **C**. La liqueur aqueuse débarrassée d'éther est filtrée, soit **D**.

**A.** — Le dépôt A constitué par de la chaux et des sels minéraux et quelques corps microbiens est traité par de l'eau chargée de 2 % d'acide sulfurique, une partie des sels minéraux est ainsi éliminée; on lave le filtre à l'eau distillée et on verse sur le précipité restant de la soude à 2 %. On obtient un liquide légèrement coloré en jaune qui précipite par HCl en excès, on le recueille, on le lave avec de l'eau chargée d'HCl, on le redissout de nouveau dans la soude à 2 % et on le reprécipite par HCl. On centrifuge, décante et on ajoute de l'alcool à 93° qui dissout le précipité, on le reprécipite, par l'éther anhydre. Il se dépose un précipité flocomeux qui lavé à l'éther et séché pèse 0 gr. 0524, il est très soluble dans les alcalis, le chlorure de sodium, les acides faibles, insoluble dans les acides concentrés; la recherche de l'azote est positive, il brûle entièrement sans résidu, il donne la réaction de Millon, mais je n'ai pu obtenir le biuret. Il ne donne pas la réaction de Weidel, mais chauffé avec KOH il laisse dégager une odeur de choline. Vu le peu de quantité de matière nous n'avons pu l'étudier plus à fond.

**B.** — Le dépôt B est constitué par des sels minéraux et de la matière organique, on le recueille, on le dissout

dans la soude à 2 %, on filtre, le filtrat est précipité par HCl en excès, le précipité recueilli de nouveau sur un filtre est dissous dans NaOH à 0,5 % et précipité par HCl en excès (le produit étant assez soluble dans NaCl.) On centrifuge, on le lave à l'alcool à 93° puis à l'alcool absolu, on le recueille et on le pèse. Les eaux mères, contenant NaCl sont additionnées d'acide trichloracétique qui précipite une faible quantité de produit probablement le même, on centrifuge, on lave à l'eau chargée d'acide trichloracétique, on reprend par H<sup>2</sup>O et on porte au bain-marie bouillant, une partie se dissout et il reste une quantité d'albumine assez faible que nous n'avons pas recueillie, donnant les réactions de Millon et du biuret.

Le corps pesé, du poids de 0 gr. 4714, est constitué par une substance ayant l'aspect des albumines sèches ne laissant aucun résidu à la calcination, présentant toutes les réactions générales des matières protéiques et précipitant par leurs agents habituels de précipitation. Elle est insoluble dans l'eau, très soluble dans les alcalis étendus, elle donne les réactions de Millon et du biuret.

### *Analyses.*

#### 1° Carbone et hydrogène :

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| Matière.....          | 0 g. 1470 |
| CO <sup>2</sup> ..... | 0 2424    |
| H <sup>2</sup> O..... | 0 1144    |

#### 2° Azote :

|                       |                                   |
|-----------------------|-----------------------------------|
| Matière.....          | 0,1914                            |
| Volume.....           | 19 cc. 8                          |
| t .....               | 14°                               |
| H <sub>15</sub> ..... | 748 <sup>m</sup> / <sub>m</sub> 5 |

3° Soufre :

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Matière.....            | 0,1029 |
| SO <sup>4</sup> Ba..... | 0,0185 |

Sa composition élémentaire serait donc :

|        |       |        |
|--------|-------|--------|
| C..... | 44,97 | p. 100 |
| H..... | 8,64  | »      |
| N..... | 11,77 | »      |
| S..... | 1,72  | »      |
| O..... | 32,90 | »      |

elle ne contient pas de phosphore.

**C.** — L'éther qui a servi à épuiser le liquide, dont les matières albuminoïdes insolubles ont été séparées, est évaporé, le résidu est repris par l'éther anhydre, filtré et évaporé de nouveau, le poids de ce résidu est de 0 gr. 1802, il a l'aspect d'une matière grasse, commençant à cristalliser. On saponifie ce corps par la baryte à l'ébullition pendant 5 heures, on filtre à chaud et on élimine l'excès de baryte par l'acide carbonique; on évapore le liquide au bain-marie, on reprend le résidu par l'eau bouillante, on filtre et l'on évapore. On obtient ainsi un résidu cristallisable, insoluble dans l'éther anhydre; chauffé, il donne des vapeurs d'acroléine, il contient du phosphore, ce sont des traces d'acide glycérophosphorique.

Dans le ballon ayant servi à la saponification par la baryte se trouve un résidu, après l'avoir additionné de 5<sup>cmc</sup> d'acide sulfurique très dilué, on l'agite avec un mélange d'alcool et d'éther, il se dissout, on neutralise l'excès d'acide sulfurique par la baryte, on sépare la liqueur éthérée que l'on évapore; on obtient ainsi un

corps blanc cristallin, de réaction acide, fondant entre  $50^{\circ}$  et  $60^{\circ}$ , très soluble dans l'éther anhydre, mais en trop petite quantité pour être recueilli et pesé, chauffé il fond et charbonne en répandant une odeur âcre. Si on le traite par un peu d'eau légèrement alcaline, il se dissout après avoir donné un précipité en premier lieu, cette solution peut être précipitée par un mélange d'alcool et d'éther; l'addition de potasse au corps acide et légèrement chauffé laisse dégager une odeur de choline. Il donne les cristaux de FLORENCE et paraît être un mélange d'un acide gras et d'une base voisine de la choline?

**D.** — Le résidu D doit contenir du glyocolle si tout n'a pas été détruit par les microbes. Je l'ai recherché par la méthode de CH.-S. FISCHER en le transformant en acide hippurique (25) :

Le résidu repris par l'eau est additionné de soude et de chlorure de benzoyle (méthode SCHOTTEN-BAUMANN), on enlève le chlorure de benzoyle en excès par l'éther, on décante, le liquide aqueux est refroidi à  $-2^{\circ}$ , on ajoute de l'éther acétique et on acidifie par HCl. On agite, on sépare, on ajoute une nouvelle quantité d'éther acétique. Ceux-ci réunis et évaporés à siccité laisse un résidu que l'on reprend par le chloroforme qui dissout l'acide benzoïque et laisse l'acide hippurique presque insoluble ( $0.001 \text{ } \%$ ); on filtre, on lave le résidu au chloroforme, on le dissout sur le filtre avec de l'eau bouillante, par refroidissement il se dépose des cristaux prismatiques blancs, très peu solubles dans l'eau froide, assez solubles dans l'eau bouillante et l'alcool, insolubles dans l'éther, fondant à  $187^{\circ} 1$ ; chauffés avec  $\text{SO}^4\text{H}^2$  ils laissent dégager  $\text{SO}^2$  et  $\text{C}^6\text{H}^5\text{CO}^2\text{H}$ .

*Analyse.*

|                                                                 |                     |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|
| Matière.....                                                    | 0,1876              |
| Volume.....                                                     | 12 <sup>cm</sup> 6  |
| t.....                                                          | 16°                 |
| H <sub>14</sub> .....                                           | 748 <sup>m</sup> /m |
| trouvé.....                                                     | N = 7,62            |
| calculé pour C <sup>8</sup> H <sup>9</sup> O <sup>3</sup> ..... | N = 7,82            |
| acide hippurique                                                |                     |

c'est de l'acide hippurique ou dibenzoylglycocolle, dont le point de fusion d'après CONRAD est 187° 5 (trouvé 187° 1).

*En résumé :* Etant parti d'un milieu de culture où n'entrait comme corps azoté que du *glycocolle* CH<sup>2</sup>—NH—COOH, corps abiurétique, ne donnant pas le Millon, et l'ayant ensemencé avec le *bacille de la diarrhée verte*, nous avons pu recueillir des corps azotés beaucoup plus complexes, biurétiques, dont nous avons pu faire une étude succincte.

Nous avons constaté que ce microbe élaborait une matière protéique que nous pouvons rapprocher du groupe des mucines et mucoïdes; d'où vient le soufre contenu dans la molécule? du sulfate de magnésie puisque dans nos bouillons ce sel est le seul corps contenant du soufre, le *bacille de la diarrhée verte* a transformé le soufre minéral du sulfate de magnésie en soufre organique. De plus nous avons constaté qu'aux dépens du glycocolle ou de la substance protéique il y avait formation d'un corps gras, probablement une lécithine, grâce aussi à la présence du glycérophosphate de chaux.

Bien que la culture fut restée pendant 119 jours à l'étuve à 37°, une partie du glycocolle était inaltérée, nous avons pu la recueillir et la caractériser.

L'hypothèse suivante nous est venue à l'esprit ; les toxines microbiennes sont-elles bien albuminoïdes ? Ne seraient-ce pas plutôt des bases analogues à la choline mais plus toxiques que celle-ci, analogues à la névrine, à la muscarine ? C'est dans cette voie que nous orientons nos recherches actuelles.

#### **Virulence de nos bouillons de culture.**

Nous avons voulu voir si les microbes perdaient leur virulence après passage dans nos milieux aminés.

Nous avons fait quelques expériences à ce sujet, expériences non décisives pourtant (1).

1° Pour la diarrhée verte en milieu tyrosine nous avons une expérience personnelle qui nous a montré que le bacille n'avait pas perdu sa virulence. Par suite d'une manipulation faite avec des cultures non stérilisées pour essayer d'obtenir le pigment colorant, nous nous sommes infecté et nous avons contracté la diarrhée verte.

2° Nous avons vérifié sur des lapins si nos cultures du bacille pyocyanique en milieu lysiné et glycocollé avaient perdu leur virulence ; celle-ci n'avait pas changé et nous avons obtenu de l'hyperthermie et les mêmes troubles qu'avec le même bacille en bouillon ordinaire.

---

(1) Nous regrettons de n'avoir pu pousser plus loin ces recherches sur la virulence de nos cultures, le temps nous a manqué ; dans un prochain mémoire nous publierons les résultats de quelques expériences en cours.

## CONCLUSIONS

---

Du travail que nous présentons aujourd'hui, nous croyons pouvoir tirer les conclusions suivantes :

- I. Il est nécessaire d'employer en bactériologie des milieux de culture chimiquement définis; ces milieux seuls, par leur composition bien déterminée et invariable, permettront de connaître d'une manière plus approfondie le chimisme microbien.
- II. De tous les milieux chimiquement définis proposés avant nous, aucun sauf celui d'ARNAUD et CHARRIN pour le *bacille pyocyannique* ne convient à la culture des microbes pathogènes.
- III. Les milieux de LEPIERRE, à base de glucoprotéines  $\alpha$ , ne sont pas des milieux chimiquement définis, puisque les glucoprotéines  $\alpha$  sont comme nous l'avons montré, des mélanges d'acides monoaminés souillés d'impuretés, probablement de polypeptides, et d'acides diaminés. Les expériences de LEPIERRE, et celles d'ARMENGAUD n'ont donc pas l'importance qu'on leur a donnée. Mais

l'idée de LÉPIERRE, que l'on doit chercher les substances nutritives azotées parmi les produits de l'hydrolyse des albumines est parfaitement exacte, seulement nous avons démontré que parmi ces produits les acides aminés sont seuls définis, *c'est donc aux acides aminés qu'il faut s'adresser.*

- IV. Nous avons essayé de cultiver quelques microbes pathogènes en faisant des milieux chimiquement définis où n'entrent, comme matériaux azotés que des acides mono et diaminés. Nous avons ainsi cultivé un certain nombre de microbes, les uns saprophytes, les autres pathogènes.
- V. Nous avons étudié la transformation du glyco-colle en matières protéiques sous l'action du microbe de la *diarrhée verte*, nous avons isolé et analysé une substance qui se rapproche des mucines et mucoïdes. A côté d'elle, nous avons trouvé des traces d'une lécithine et du glyco-colle inaltéré malgré le temps assez long passé à l'étuve à 37°.
- VI. Nous émettons l'hypothèse que les toxines microbiennes seraient plutôt des bases du groupe de la choline, névrine, muscarine, plutôt que des corps albuminoïdes.
- VII. L'emploi des milieux de culture chimiquement définis est une méthode qui doit donner les meilleurs résultats dans l'étude des toxines et

doit faciliter ainsi les recherches concernant la vaccination, l'immunisation et la sérothérapie en général, pour le plus grand profit de la thérapeutique des maladies infectieuses.

Vu :

*Le Président de la Thèse,*  
L. HUGOUNENQ.

Vu :

*Le Doyen,*  
L. HUGOUNENQ.

PERMIS D'IMPRIMER :

Lyon, le 9 janvier 1907,

*Le Recteur de l'Académie,*  
*Président du Conseil de l'Université,*

JOUBIN.

---

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

---

### 1<sup>o</sup> Ouvrages généraux.

- COHNHEIM. — Chemie der Eiweiskörper, 1904.
- COURMONT (J.). — Précis de bactériologie pratique, 1907.
- FISCHER (E.). — Untersuchungen über Aminosäuren polypeptide und proteine, 1906.
- GAUTIER (A.). — Traité de chimie biologique.
- HUGOUNENQ. — Précis de chimie biologique.
- TIERFELDER. — Chemischen analyse, 1903.

### 2<sup>o</sup> Mémoires originaux.

- (1) ABDERHALDEN et PREGL. — Die Monoaminosäuren des Kristallisierten Eialbumins (*Zeitsch. für phys. Chem.*, t. XLVI, p. 19, 1905.)
- (2) ABDERHALDEN. — Hydrolyse des kristallisierten Oxyhäoglobins aus Pferdeblut. (*Zeitsch. f. phys. Chem.*, t. XXXVII, p. 484, 1903.)
- (3) ABDERHALDEN et E. LE COUNT. — Die Monoaminosäuren des Keratins aus Gausefedern. (*Zeitsch. f. phys. Chem.* t. XLVI, p. 40, 1905.)
- (4) ANTOINE. — De la multiplicité des produits fournis par un microbe pathogène. (Des caractéristiques biochimiques du bacille pyocyanique). — *Thèse de doct. pharmacie*, Paris, 1903. Bodin édit.

- (5) ARMENGAUD. — Les milieux chimiquement définis en bactériologie. Les glucopotéines α. (Thèse de Lyon, 1905.)
- (6) ARNAUD et CHARRIN. — Recherches chimiques sur les sécrétions microbiennes. Transformation et élimination de la matière organique azotée par le bacille pyocyanique dans un milieu de culture déterminé. (*C. R. Acad. Sc.*, t. CXII, p. 755.)
- (7) ARNAUD et CHARRIN. — Recherches chimiques et physiologiques sur les sécrétions microbiennes. Transformation et élimination de la matière organique par le bacille pyocyanique. (*C. R. Acad. Sc.*, t. CXII, p. 1157, 1891.)
- (8) BABÈS. — Note sur quelques matières colorantes et aromatiques produites par le bacille pyocyanique (*Bull. Soc. biologie*, (9), t. I., p. 438, 1889.)
- (9) BÉCHAMP. — De l'influence que l'eau pure ou chargée de divers sels exerce à froid sur le sucre de canne. (*Ann. chim. et phys.* (3), t. LIV, p. 28, 1858.)
- (10) BLEUNARD. — (*Thèse doct. Sciences*, Paris, n° 468, 1881.)
- (11) BRACONNOT. — Sur la conversion des matières animales en nouvelles substances par le moyen de l'acide sulfurique. (*Ann. chim. et phys.*, t. XIII, p. 113, 1820.)
- (12) COHN. — Untersuchungen über Bacterien. (*Beiträge zur biologie der Pflanzen*, I, fasc. 2, p. 195, 1872.)
- (13) DRECHSEL. — Sur Kenntniss des Lysins (*Ber. chem. Gesell.*, t. XXV, p. 2454, 1892.)
- (14) DUFLOQ, LEJEUNE et BERTRAND. — La culture des organismes inférieurs dans l'eau de mer, diversement modifiée. (*Soc. méd. Hopit.*, 27 janvier 1899, p. 89.)
- (15) ELLINGER. — Die Constitution des Ornithins und des Lysins. (*Zeitsch. f. phys. Chem.*, t. XXIX, p. 334, 1900.)
- (16) ELLINGER. — (*Ber. chem. Gesell.*, t. XXXII, p. 3542, 1899.)
- (17) ENGEL. — Sur les caractères du glycocolle. (*C. R. Acad. Sc.*, t. LXXX, p. 1168, 1875.)

- (18) FERMI. — Weiter Untersuchungen über die Tryptische Enzyme der Microorganismen. (*Centralb. für. phys.*, t. V, p. 481, 1891.)
- (19) FERMI et PEROSI. — Voir Précis de bactériologie de J. COURMONT (1907).
- (20) FISCHER (E.). — Ueber die Hydrolyse des Caseins durch Salzsäure. (*Zeitsch. f. phys. Chem.*, t. XXXIII, p. 151, 1901.)
- (21) FISCHER (E.). — Ueber die Entstehung von  $\alpha$ -Pyrrolidin-carbonsäure und Phenylalanin bei der Hydrolyse des Eialbumins. (*Zeitsch. f. phys. Chem.*, t. XXXIII, p. 412, 1901.)
- (23) FISCHER (E.). — Synthese der  $\alpha$ -Diaminoverlensäure. (*Ber. Chem. Gesell.* t. XXXIV, p. 454, 1901.)
- (24) FISCHER (E.) et WEIGERT. — Synthese der  $\alpha$ -Diaminocaproonsäure (*Ber. chem. Gesell.*, t. XXXV, p. 3772.)
- (25) FISCHER (Ch.-S.). — Ueber die quantitative Bestimmung des Glycocolls in den Zersetzungsproducten der gelatine. (*Zeitsch. für phys. Chem.*, t. XIX, p. 164, 1894.)
- (26) FRÄNKEL. — (*Sitz. Akad. Wien*, t. CXII, 1903.)
- (27) FRÄNKEL. — Abbau des Histidins. (*Beiträge zur chem. phys. und Path.*, t. VIII, p. 156, 1906.)
- (28) GALIMARD. — Sur une albumine extraite des œufs de grenouille. (*C. R. Acad. Sc.*, t. CXXXVIII, p. 1354, 1904.)
- (29) GALIMARD, LACOMME et MOREL. — Sur la vraie nature des glucoprotéines  $\alpha$  de M. Lepierre. (*C. R. Acad. Sc.*, t. CXLIII, p. 298, 1906.)
- (30) GALIMARD, LACOMME et MOREL. — Culture des microbes en milieux chimiquement définis. (*C. R. Acad. Sc.*, t. CXLIII, p. 349, 1906.)
- (31) GAUTIER (A.). — L'iode dans l'eau de mer. (*C. R. Acad. Sc.*, t. CXXXVIII, p. 1069, 1899.)
- (32) GULEWITSCH. — Ueber das Arginin. (*Zeitsch. f. phys. Chem.*, t. XXVIII, p. 179, 1899.)

- (33) HART. — Ueber die quantitative Bestimmung der Spaltungsprodukte der Eiweisskörper. (*Zeitsch. f. phys. Chem.*, t. XXXIII, p. 347, 1901.)
- (34) HEDIN. — Zur Kenntniss der Spaltungsproducte der Proteinkörper. (*Zeitsch. fur phys. Chem.*, t. XXII, p. 191, 1896.)
- (35) HEDIN. — Ueber ein neues Spaltungsproduct des Hornsubstanzen. (*Zeitsch. f. phys. Chem.*, t. XX, p. 186. 1895.)
- (36) HERZOG. — Notiz über Histidin. (*Zeitsch. f. phys. Chem.*, t. XXXVII, p. 248, 1902.)
- (37) HUEPPE. — Die Methoden der Bakterien Forschung, 4<sup>e</sup> édit., 1889.
- (38) HUGOUNENQ. — Recherches sur la Vitelline. (*Journ. Phys. et Path. gen.*, t. VIII, p. 209, 1906.)
- (39) HUGOUNENQ. — Conquêtes récentes de la chimie dans l'étude des albumines. (*Conférence à la Société lyonnaise de la Société chimique de Paris*, 1904.)
- (40) HUGOUNENQ. — Sur une albumine extraite des œufs de poissons ; chimie comparée des productions sexuelles dans la même espèce. (*C. R. Acad. Sc.*, 25 avril 1904.)
- (41) HUGOUNENQ et DOYON. — A propos de la culture du bacille de Lœffler en milieu chimiquement défini. (*C. R. Soc. biologie*, p. 401, 1896.)
- (42) HUGOUNENQ et DOYON. — Contribution à l'étude des actions chimiques des microbes pathogènes. (*Arch. Phys.* (5), t. X, p. 386, 1898).
- (43) HUGOUNENQ et GALIMARD. — Sur les acides diaminés de l'ovalbumine. (*C. R. Acad. Sc.*, 23 juillet 1906.)
- (44) HUGOUNENQ et MOREL. — Sur la nature véritable des leucines et glucoprotéines obtenues par P. Schützenberger dans le dédoublement des matières protéiques. (*C. R. Acad. Sc.*, t. CXLII, p. 1426, 1906.)
- (45) HUGOUNENQ et MOREL. — Contribution à l'étude de la cons-

titution des matières albuminoïdes (Recherches sur la vraie nature des glucoprotéines et leucéines de Schutzenberger). (*Communic. à la Soc. chim.*, Paris, mai 1906.)

- (46) JAFFÉ. — Ueber das Verhalten der Benzoësäure in Organismus der Vögel. (*Ber. chem. Gesell.*, t. X, p. 1925, 1877, et t. XI, p. 406, 1878.)
- (47) JODIN. — Sur la fermentation alcoolique spontanée. (*C. R. Acad. Sc.*, t. LIII, p. 1252, 1861, et t. LIV et LVII.)
- (48) KNOOP et WINDHAUS. — Die Konstitution des Histidins. (*Beiträge zur chem. phys. u. path.*, t. VIII, 156, 1906.)
- (49) KOSSEL. — Ueber die basischen Stoffe des Zellkerns. (*Zeitsch. f. phys. Chem.*, t. XXII, p. 176, 1896.)
- (50) KOSSEL. — Nouvelles recherches sur la structure des protamines et des protones. Existence de groupement diarginyl dans ces molécules. (*Congrès de l'Assoc. franç. pour l'Avanc. Sc.* Lyon, 1906.)
- (51) KOSSEL et DAKIN. — Ueber die Arginase. (*Zeitsch. für phys. Chem.*, t. XLI, p. 321, 1904.)
- (52) KOSSEL et KUTSCHER. — Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper. (*Zeitsch. für phys. Chem.*, t. XXXI, p. 165, 1900.)
- (53) KOSSEL et PÄTTEN. — Zur analyse der Hexonbasen. (*Zeitsch. für phys. Chem.*, t. XXXVIII, p. 39, 1903.)
- (54) KRAUT. — Glycocolle und Derivate. (*Ann. chem. pharm. Lieb.*, t. CCLXVI, p. 292, 1891.)
- (55) KUTSCHER et SCHENK. — Zur kenntniss der Oxalurie. (*Zeits. f. phys. Chem.*, t. XLIII, p. 337, 1904.)
- (56) LACOMME. — Les microbes de Winogradsky. (*Bull. Soc. méd. hôp.* Lyon, 1903.)
- (57) LACOMME et MOREL. — Les glucoprotéines comme milieux de culture des microbes. (*Soc. méd. hôpit.* Lyon, 5 déc. 1905.)

- (58) LEPIERRE. — Les glucoprotéines comme nouveaux milieux de culture chimiquement définis pour l'étude des microbes. (*C. R. Acad. Sc.*, t. CXXXIII, p. 113, 1901.)
- (59) LEPIERRE. — Les glucoprotéines comme nouveaux milieux de culture chimiquement définis pour l'étude des microbes. (*Journ. Phys. et Path. gén.*, p. 323, 1903.)
- (60) LIEBIG. — (*Ann. Chem. pharm. Lieb.*, t. LVII, p. 62.)
- (61) MAYER. — Untersuchung über die alkoholische Gährung (Heidelberg, 1869). — Recherches sur la fermentation alcoolique et la nutrition du champignon de la levure. (*Traduit de l'allemand in Monit. scientifique*, p. 291, 1872.)
- (62) MULDER. — Ueber den Leimzucker und das Leucin. (*Journ. für prakt. chem.*, t. XVI, p. 290, et XXXVIII, p. 294.)
- (63) NÖGELI. — Ernährung der Niedere Pilze. (*Sitz. Münchener Acad.*, 1879.)
- (64) NENCKI. — Ueber die Harnfarbstoffe aus der Indigogruppe und über die Pankreasverdauung. (*Ber. Chem. Gesell.*, t. VII, p. 1593, 1874.)
- (65) OUCHINSKY. — Recherches sur la nature des poisons de la diphtérie et du choléra. (*Archiv. méd. expériment.*, p. 293, 1893.)
- (66) OUCHINSKY. — Ueber eine eiweissfreie Nährlösung für Pathogene Bakterien nebst einigen Bemerkungen über Tetanusgrift. (*Centralb. für Bakterio.*, t. II, p. 316, 1893.)
- (67) PASTEUR. — Mémoire sur la fermentation lactique. (*C. R. Acad. Sc.*, t. XLV, p. 913, 1857.)
- (68) PASTEUR. — Mémoire sur la fermentation alcoolique. (*Ann. chim. et phys.*, t. LVIII, p. 323, 1860.)
- (69) PASTEUR. — Série de mémoires dans *C. R. Acad. Sc.*, t. I et II, 1860.)
- (70) PAULY. — Ueber die Konstitution des Histidins. (*Zeitsch für phys. chem.*, t. XLII, p. 503, 1904.)

- (71) PROUST. — Recherches sur le principe qui assaisonne les fromages (*Ann. chim. et phys.*, t. X, p. 40, 1819.)
- (72) RAULIN. — Etudes chimiques sur la végétation. (*thèse doct. ès-sciences*, Paris, 1870.)
- (73) SALKOWSKI. — Weitere Beiträge zur theorie der Harnstoffbildung (*Zeitsch. für phys. chem.*, t. IV, p. 100, 1880.)
- (74) SCHULZE et STEIGER. — Ueber das Arginin. (*Zeitsch. für phys. chem.*, t. XI, p. 43, 1887.)
- (75) SCHULZE et WINTERSTEIN. — Beiträge zur kenntniss des Arginins und des Ornithins. (*Zeitsch. für phys. Chem.*, t. XXXIV, p. 128, 1901.)
- (76) SCHULZE et WINTERSTEIN. — Ueber die Bildung von Ornithin bei der Spaltung des Arginins und über die Constitution dieser beiden Basen. (*Zeitsch. für phys. Chem.*, t. XXVI, p. 1, 1898.)
- (77) SCHUTZENBERGER. — Recherches sur l'albumine et les matières albuminoïdes (*Bull. Soc. chim.*, (2) t. XXIII, p. 161, 1875.)
- (78) SCHUTZENBERGER. — Mémoire sur les matières albuminoïdes. (*Ann. phys. et chim.* (5), t. XVI, p. 289, 1879.)
- (79) STRECKER. — Untersuchung der Ochsen-galle. (*Ann. Chem. Pharm. Lieb.*, t. LXVII, p. 25, 1848, et t. LXX, p. 188.)
- (80) VAN TIEGHEM. — Fermentation gallique. (*Ann. Sc. natur. botanique*, t. VIII, p. 210, 1867.)
- (81) WÄCHLI. — Fäulnisproduct. d. Elastins u. Mucins. (*Ber. chem. Gesell.*, t. XI, p. 509, 1878.)
- (82) WEIGERT. — Notiz zur Konstitution des Histidins. (*Zeits. für phys. Chem.*, t. XXXIX, p. 213, 1903.)
- (83) WINDHAUS et KNOOP. — Zur Konstitution des Histidin. (*Beiträge zur Chem. phys. u. path.*, t. VIII, p. 406, 1906.)

## TABLE DES MATIÈRES

---

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION. . . . .                                                                                                       | 1  |
| PREMIÈRE PARTIE. — Les milieux de culture chimiquement<br>définis. . . . .                                                  | 5  |
| CHAPITRE I <sup>er</sup> . — Historique. . . . .                                                                            | 5  |
| CHAPITRE II. — Les glucoprotéines . . . . .                                                                                 | 17 |
| A. Étude des glucoprotéines de Schützenberger . . . .                                                                       | 21 |
| B. Étude des glucoprotéines de Ch. Lepierre . . . . .                                                                       | 26 |
| DEUXIÈME PARTIE. — Les acides aminés comme milieux de<br>culture. . . . .                                                   | 35 |
| CHAPITRE I <sup>er</sup> . . . . .                                                                                          | 35 |
| § 1 <sup>er</sup> . — Extraction des acides aminés par l'hydrolyse<br>des matières albuminoïdes . . . . .                   | 35 |
| § 2. — Purification des produits obtenus . . . . .                                                                          | 41 |
| CHAPITRE II. — Propriétés de quelques acides aminés . . .                                                                   | 45 |
| § 1 <sup>er</sup> . Arginine. . . . .                                                                                       | 45 |
| § 2. Histidine. . . . .                                                                                                     | 46 |
| § 3. Lysine. . . . .                                                                                                        | 48 |
| § 4. Ornithine . . . . .                                                                                                    | 49 |
| § 5. Glycocolle . . . . .                                                                                                   | 50 |
| § 6. Alanine. . . . .                                                                                                       | 52 |
| § 7. Leucine . . . . .                                                                                                      | 53 |
| § 8. Tyrosine. . . . .                                                                                                      | 54 |
| CHAPITRE III. — Composition de nos milieux de culture.<br>Résultats obtenus . . . . .                                       | 56 |
| CHAPITRE IV. — Nature chimique de quelques produits<br>fabriqués par les microbes aux dépens des acides<br>aminés . . . . . | 67 |
| Culture du bacille de la <i>diarrhée verte</i> en glycocolle. .                                                             | 70 |
| Virulence de nos bouillons de culture. . . . .                                                                              | 77 |
| Conclusions. . . . .                                                                                                        | 78 |
| Index bibliographique . . . . .                                                                                             | 81 |



